

AKUTE UND CHRONISCHE WIRKUNGEN DES
MORPHINS AUF DEN STOFFWECHSEL DES
SEROTONINS UND DER KATECHOLAMINE IM
ZENTRALNERVENSYSTEM DER RATTE

PETER THEISS

1976

AKUTE UND CHRONISCHE WIRKUNGEN
DES MORPHINS AUF DEN STOFFWECHSEL
DES SEROTONINS UND DER KATECHOLAMINE
IM ZENTRALNERVENSYSTEM DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
IM FACHBEREICH CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN



VORGELEGT VON
PETER THEISS
AUS PÜTTLINGEN/SAAR

MÜNCHEN

1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Stachel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz

Als Dissertation angenommen am: 21. Oktober 1975

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 1976

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München (Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie) in der Abteilung Neuropharmakologie auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. A. Herz (Leiter dieser Abteilung und derzeitiger Leiter des Theoretischen Institutes) angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-D. S t a c h e l für die Genehmigung dieser Arbeit und für sein Interesse und seine freundliche Hilfestellung an ihrem Fortgang.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. H e r z . Seine stets großzügige Unterstützung in allen fachlichen Belangen sowie seine persönliche Aufmerksamkeit trugen entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei.

Meinem Freund, Dr. Raffaello P a p e s c h i , Lucca/Italien, danke ich für viele wertvolle Diskussionen und methodische Hinweise.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Neuropharmakologie danke ich für die immer freundliche Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL

1. EINLEITUNG	Seite
1.1. Akute und chronische Wirkungen des Morphins	1
1.2. Nachweis der Toleranzentwicklung im Tierexperiment	2
1.3. Hypothesen zur Erklärung der Morphinwirkungen	5
1.4. Überträgersubstanzen im Zentralnervensystem: Serotonin, Dopamin und Noradrenalin (biogene Amine)	7
1.4.1. Ihr Metabolismus	7
1.4.2. Ihre Lokalisation und Funktion	12
1.4.3. Ihre Beziehungen zu subzellulären Strukturen und zur Nervenfunktion	13
1.4.4. Möglichkeiten zur Bestimmung ihres Umsatzes	17
1.5. Bisherige Befunde über den Einfluß von Morphin auf den Stoffwechsel der biogenen Amine	18
2. PROBLEMSTELLUNG	22
3. METHODEN	
3.1. Methoden zur Bestimmung des Stoffwechsels der biogenen Amine	23
3.1.1. Blockierung des aktiven Transportes der Säure- und Alkoholmetabolite aus dem Zentralnervensystem und Liquor	23
3.1.2. Hemmung der Tryptophan- und Tyrosinhydroxylase	25
3.2. Methoden zur Trennung und quantitativen Erfassung der biogenen Amine und ihrer Hauptmetabolite aus dem Gehirn von Ratten	29
3.2.1. Übersicht	29
3.2.2. Extraktionsmethode zur gemeinsamen Bestimmung der Homovanillinsäure und der 5-Hydroxyindolessigsäure	33
3.2.3. Adsorptionsmethode mit Aluminiumoxyd zur gemeinsamen Bestimmung von Dopamin und Noradrenalin	37

3.2.4.	Gemeinsame Bestimmung von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin nach Trennung mit einem schwachen Kationenaustauscher	40
3.2.5.	Bestimmung des 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykolsulfates nach Anionenaustausch auf einer DEAE Sephadexsäule	42
4.	ERGEBNISSE	44
4.1.	Akute Morphingabe	44
4.2.	Chronische Morphingabe	53
5.	DISKUSSION	60
5.1.	Akute Morphinwirkungen	60
5.2.	Chronische Morphinwirkungen	67
<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>		75
1.	Materialien	75
1.1.	Substanzen	75
1.2.	Geräte	80
2.	Tierversuche	80
3.	Methoden der Analysen	82
3.1.	Homovanillinsäure und 5-Hydroxyindol-essigsäure (Extraktion)	82
3.2.	Dopamin und Noradrenalin (Adsorption mit Al_2O_3)	85
3.3.	Dopamin, Noradrenalin und Serotonin (Kationenaustausch)	87
3.4.	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykolsulfat (Anionenaustausch)	89
4.	Auswertung und statistische Bewertung der Ergebnisse	90
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>		93
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>		98

A L L G E M E I N E R

T E I L

1. E I N L E I T U N G

1.1. AKUTE UND CHRONISCHE WIRKUNGEN DES MORPHINS

Die einzigartige Wirkung des Morphins und synthetischer morphinartiger Substanzen (Opiate), die Hemmung der Schmerzempfindung bei nahezu voll erhaltenem Bewußtsein, macht diese Gruppe von Pharmaka für die Therapie starker Schmerzzustände unentbehrlich. Neben der Schmerzempfindung beeinflussen die Opiate jedoch eine Reihe weiterer Körperfunktionen. So kommt es als unerwünschte Nebenwirkungen zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels, zu Atemdepression, Blutdruck- und Temperaturabfall sowie zu Obstipation, Übelkeit und Pupillenverengung.

Diese vielfältigen physischen Veränderungen gehen mit einer tiefgreifenden Beeinflussung der allgemeinen Stimmungslage einher, die als überaus angenehm empfunden wird und nach Wiederholung verlangt: es entsteht psychische Abhängigkeit. Wird ein Opiat in kurzen Abständen verabreicht (Theiss et al., 1974), läßt seine Wirkung mehr und mehr nach. Der Körper gewöhnt sich an die fortdauernden, durch die Substanz hervorgerufenen Veränderungen, er entwickelt ihr gegenüber Toleranz und benötigt das Opiat schließlich zur Aufrechterhaltung des neu erstellten funktionellen Gleichgewichts.

Parallel zur Toleranz hat sich somit mehr oder weniger unmerklich körperliche Abhängigkeit entwickelt (Way et al., 1969; Theiss et al., 1974). Im weiteren Text werden deshalb die Ausdrücke "Toleranz", "Abhängigkeit" und "Toleranz/Abhängigkeit" in gleicher Bedeutung gebraucht.

Wird die Opiatzufuhr unterbrochen, oder werden spezifische Antagonisten verabreicht, die das Morphin von seinem Wirkungsort kompetitiv verdrängen, dann manifestiert sich diese körperliche Abhängigkeit in einem Entzugssyndrom, das in vielem ein genau entgegengesetztes Bild des nach akuter Morphingabe auftretenden Symptomenkomplexes darstellt (Bläsig et al., 1973). Es kommt zu einer allgemeinen Übererregbarkeit des zentralen und vegetativen Nervensystems sowie zu Angst und Halluzinationen.

1.2. NACHWEIS DER TOLERANZENTWICKLUNG IM TIEREXPERIMENT

Die oben dargestellten Hauptwirkungen des Morphins - die Analgesie, die Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung - lassen sich im Tierexperiment sehr gut nachweisen. Kleine Nager, wie Ratten und Mäuse eignen sich für biochemische Untersuchungen besonders gut, da sie leicht zu handhaben sind, in großer Zahl zur Verfügung stehen und darüber hinaus ein Entzugsbild zeigen, das viele Ähnlichkeiten mit dem des Menschen aufweist.

Hohe Grade körperlicher Abhängigkeit lassen sich in kurzer Zeit dadurch zeigen, daß man das Morphin als Depot-Tabletten (Pellets) unter die Haut der Tiere implantiert (Way et al., 1969), wodurch ein kontinuierlicher Resorptionsstrom gewährleistet wird. Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden ausschließlich an Ratten durchgeführt. In diesen Tieren wurden unterschiedliche Grade von Toleranz und Abhängigkeit induziert, indem a) die Menge der pro Implantation verabreichten Pellets, b) das zeitliche Intervall zwischen den einzelnen Implantationen, sowie c) die Gesamtdauer der Implantationsperiode variiert wurde. Die unterschiedlich stark tolerant/abhängigen Gruppen wurden mit Codenummern versehen, wobei die erste Nummer die gesamte Anzahl der implantierten Pellets, die zweite Nummer die Dauer der chronischen Morphineinwirkung in Tagen angibt. Jedes Pellet enthielt 75 mg Morphinbase neben Cellulose als Füllmittel, welche wegen ihrer schlechten Löslichkeit in der Gewebeflüssigkeit die Depotbildung bewirkt (Herstellungsvorschrift siehe Experimenteller Teil, Kap. 1.1.) Nur in einem speziellen Versuch wurde das Morphin den Tieren bis zur Entwicklung einer vollkommenen Toleranz gegenüber der analgetischen Wirkung injiziert. Kontrollratten wurden in der gleichen Häufigkeit wie die Tiere der Morphingruppen mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert oder bei den Implantationsversuchen mit Placebopellets, welche nur die Trägersubstanz enthielten, implantiert.

Der jeweilige Toleranzgrad wurde über die Höhe des Verlustes der analgetischen Wirkung des Morphins ermittelt. Als analgetischer Test wurde eine nozizeptive Reaktion, die Vokalisation bei elektrischer Reizung der Schwanzwurzel benutzt (Hoffmeister, 1968); es wurde die Effektivdosis von Morphin ermittelt, welche eine Erhöhung der Reizschwelle auf 1100 μ A (etwa das Vierfache der Ausgangsschwelle) eine Stunde nach der s.c. Injektion von Morphin bewirkte. In allen mit Morphinpellets implantierten Gruppen wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und diese dann mit derjenigen naiver Tiere verglichen (Abb. 1).

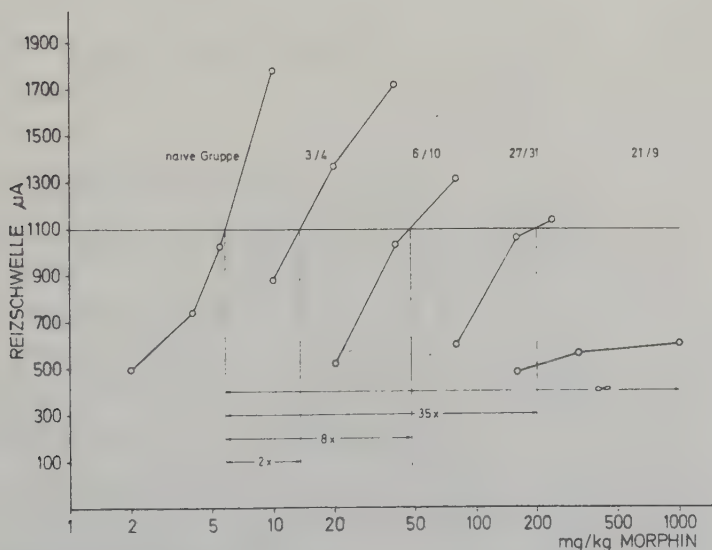


Abb. 1: Dosiswirkungskurven für die antinozizeptive Wirkung von akut injiziertem Morphin bei naiven Ratten und Ratten verschiedenen stark toleranter Gruppen. Ordinate: Reizschwelle in Mikroampere; Abszisse: Morphindosis in mg/kg (s.c. Injektion). Jeder Punkt gibt den Mittelwert von mindestens 10 Tieren an.

Die verschiedenen Implantationsmuster führten zu einem stark unterschiedlichen Toleranzgrad, der von der 3/4-Gruppe zu der 6/10, der 27/31 und 21/9-Gruppe anstieg; neben der Verschiebung nach rechts wurden die Dosiswirkungskurven auch immer flacher. Die Morphin-dosis, die zur Verhinderung einer Vokalisation bei der Reizstärke von 1100 uA notwendig war, stieg in der 3/4-Gruppe um das Zweifache gegenüber den naiven Tieren an, in der 6/10 um das Achtfache, in der 27/31 um das Fünfunddreißigfache und war in der 21/9-Gruppe sogar nicht mehr meßbar.

1.3. HYPOTHESEN ZUR ERKLÄRUNG DER MORPHINWIRKUNGEN

Die chronischen Wirkungen des Morphins wurden erstmalig vor dreißig Jahren von Himmelsbach (1943) mit seiner allgemeinen Homöostasetheorie zu erklären versucht. Danach stört Morphin mit seinen fast durchweg depressorischen Wirkungen das Gleichgewicht verschiedener zentraler Funktionen im Zentralnervensystem (ZNS) und induziert somit kompensatorische Gegenregulationsmechanismen zur Wiederherstellung eines neuen Gleichgewichts. Fällt der durch Morphin ausgelöste depressorische Reiz bei Unterbrechung der Morphinzufuhr weg, dann bricht das neuerstellte Gleichgewicht zusammen und der bis dahin latent gebliebene Zustand einer "autonomen Übererregbarkeit" manifestiert sich im Entzugsgeschehen.

Im letzten Jahrzehnt aufgestellte Hypothesen über das Zustandekommen einer solchen kompensatorischen Übererregbarkeit gehen teilweise von Veränderungen im Gehalt von synaptischen Überträgersubstanzen aus. Unter anderem wurde postuliert, daß Morphin die Freisetzung einer erregenden Überträgersubstanz im ZNS blockiert, was zu einem Reizdefizit an der nachgeschalteten synaptischen Membran führt. Dieses Reizdefizit beantwortet bzw. kompensiert die Membran durch Steigerung ihrer Empfindlichkeit gegenüber diesem Transmitter. Wird bei Morphinentzug die Freisetzungsblokade aufgehoben, trifft eine normale Menge der Überträgersubstanz auf eine überempfindliche Membran. Es kommt zu überschießenden Effekten: den Entzugssymptomen (disuse supersensitivity nach Jaffé and Sharpless, 1968).

Eine andere Theorie geht ebenfalls davon aus, daß Morphin die Aktivität, Synthese oder Freisetzung eines erregenden oder hemmenden Transmitters beeinflusst (Goldstein, 1961). Sie führt die Kompensation dieser Störung jedoch auf einen präsynaptischen Mechanismus zurück, nämlich auf eine vermehrte Neusynthese oder Akkumulation dieses Transmitters. Diese Theorie wird durch eine Reihe von Befunden gestützt, die zeigen, daß Morphin entscheidend in den Stoffwechsel von Überträgersubstanzen eingreift.

1.4. ÜBERTRÄGERSUBSTANZEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM:
SEROTONIN, DOPAMIN UND NORADRENALIN (BIOGENE AMINE)

1.4.1. IHR METABOLISMUS

Soweit es heute bekannt ist, können die Überträger-
substanzen (Transmitter), die für die Übermittlung
von Nervenimpulsen an den Synapsen verantwortlich sind,
ihrer chemischen Struktur nach in biogene Amine (BA)
und Aminosäuren unterschieden werden. Die wesentli-
chen BA im Gehirn sind Serotonin oder 5-Hydroxytryp-
tamin (5-HT) (Brodie and Shore, 1957; Livett et al.,
1968), Noradrénalin (NA) (von Euler and Hillarp,
1956) und Dopamin (DA) (Sourkes and Poirier, 1968;
NA + DA: Iversen, 1967; Sharman, 1973). Doch auch
Histamin und Acetylcholin besitzen Transmitterfunk-
tionen im ZNS, wobei die Rolle des letzteren als
Transmitter im peripheren parasympathischen Nerven-
system schon früher bekannt war und besser untersucht
ist (zur Übersicht siehe Valzelli, 1973).

Von den Aminosäuren ist vor allem die Gammaaminobutter-
säure (GABA) (Elliot and van Gelder, 1959; Iversen, 1972)
im ZNS und im Rückenmark als inhibitorischer Transmitter
bekannt. Auch die Asparaginsäure, die Glutaminsäure,
(Krnjevic, 1970) und das Glycin (Werman et al., 1968)
werden, obwohl sie noch anderen metabolischen Funktio-
nen folgen, als Überträgersubstanzen angesehen, zumal
sie ebenso wie die GABA und die BA hochaffine Aufnahmesys-

teme in die Nervenendigungen (Bennett et al., 1974) besitzen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des Morphins auf den Metabolismus der wesentlichen Überträgersubstanzen, der Monoamine 5-HT, DA und NA untersucht. Abbildung 2 zeigt die einzelnen Schritte im chemischen Ablauf dieser Metabolismen.

Serotonin ist ein Indolamin, welches aus Tryptophan, einer essentiellen Aminosäure, gebildet wird. Diese wird am C-Atom 5 des Indolringes von dem spezifischen Enzym Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert. Die Synthese der Katecholamine (KA), des DA und NA, verläuft ähnlich. Hier wird die essentielle Aminosäure Tyrosin durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase in Dihydroxyphenylalanin (DOPA) übergeführt. Beide Hydroxylierungen sind die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im gesamten Stoffwechsel der Monoamine (5-HT, Koe, 1971; KA, Levitt et al., 1965). Von einem weiteren Enzym, der aromatischen L-Aminosäuredekarboxylase (Lovenberg et al., 1962; Udenfried et al., 1973) werden dann sowohl 5-HTP zu Serotonin als auch DOPA zu Dopamin dekarboxyliert.

Unter normalen Bedingungen folgen im ganzen Körper nur 1 - 2 % des Tryptophangehaltes diesem metabolischen Weg (Udenfried et al., 1956). Im vegetativen Nervensystem

METABOLISMUS DES SEROTONINS UND DER KATECHOLAMINE

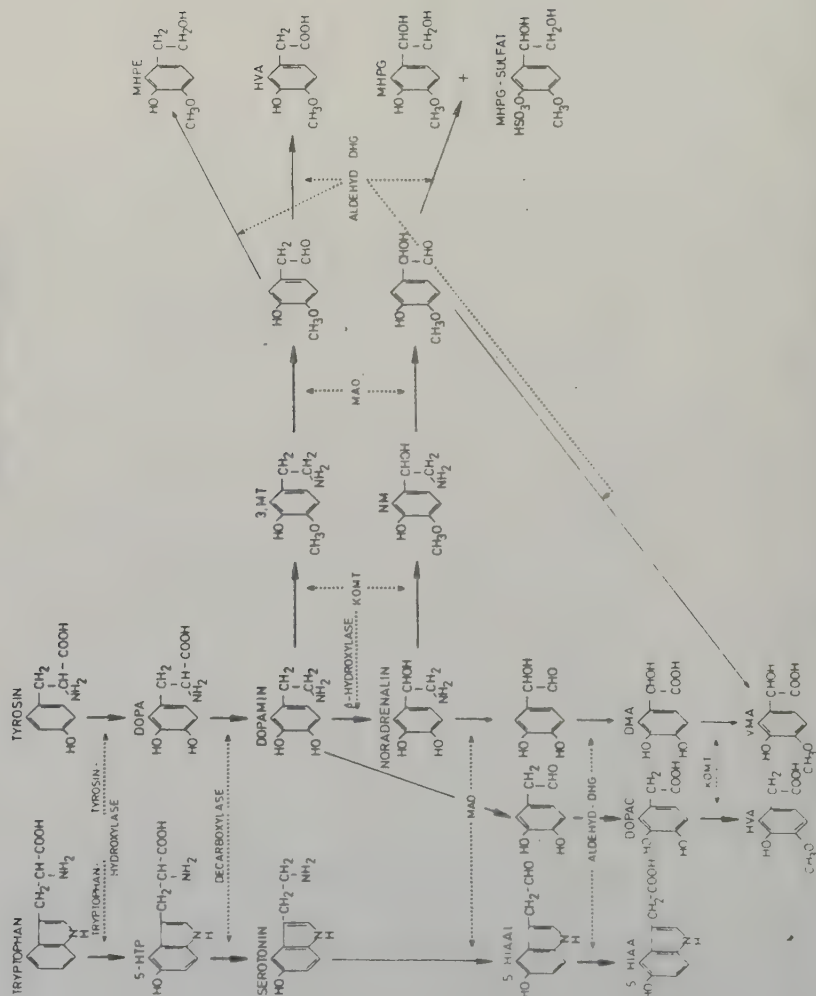


Abb. 2:

Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte des Stoffwechsels von Serotonin,

Dopamin und Noradrenalin im ZNS.

→ zeigt die Hauptwege

→ zeigt die Nebenwege

..... zeigt die Enzymwirkungen.

Es ist zu beachten, daß der Abbau des Serotonins nur über das Enzym MAO und nicht

wie bei Dopamin und Noradrenalin auch über das Enzym KOMT läuft.

Abkürzungen und Synonyme:

ALDEHYD-

DHG

Aldehyddehydrogenase

KOMT

Katechol-o-methyltransferase

DMA

3,4-Dihydroxymandelsäure

MAO

Monoaminoxidase

DOPA

1-3,4-Dihydroxyphenylalanin

MHP

4-Hydroxy-3-methoxyphenyläthanol (MOPET)

DOPAC

3,4-Dihydroxyphenylessigsäure

MHPG

4-Hydroxy-3-methoxyphenyläthylenglycol (MOPEG)

5-HIAA

5-Hydroxyindoleessigsäure

3-MT

3-Methoxytyramin

5-HIAA1

5-Hydroxyindolacetaldehyd

NM

Nor-nephrin

5-HTP

5-Hydroxytryptophan

VMA

4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure =

HVA

4-Hydroxy-3-methoxyphenylessigsäure = Homovanillinsäure

Vanillinmandelsäure

wird Serotonin auf verschiedenen metabolischen Wegen weiter abgebaut, im ZNS jedoch geht der einzige Abbauweg über die Oxydation durch die Monoaminoxydase (MAO), ein in den Mitochondrien enthaltenes Enzym, welches zu dem Zwischenprodukt 5-Hydroxyindolaldehyd führt. Unter Wirkung der Aldehyddehydrogenase entsteht dann der letzte und hauptsächliche (Zeller, 1961) Metabolit des Serotonins, die 5-Hydroxy-indolessigsäure (5-HIAA).

Aus Dopamin wird in den Speichervesikeln durch die Dopaminbetahydroxylase Noradrenalin gebildet. Die Inaktivierung der KA kann auf zwei Wegen verlaufen; entweder erfolgt zuerst die oxydative Desaminierung und dann die Metylierung am C-Atom 3 des aromatischen Ringes oder umgekehrt. Die Endabbauprodukte sind für beide Abbauege gleich. Die Richtung der Hauptabbauege ist in Abb. 2 durch verstärkte Pfeile angezeigt. So wird der Teil der KA, welcher zuerst durch die Katechol-orthomethyltransferase (KOMT) in die Metabolite Normetanephrin (NM) und 3-Methoxytyramin (3-MT) abgebaut wurde, weiter durch die MAO in den Mitochondrien oxydativ desaminiert und danach in Homovanillinsäure (HVA) und Methoxyhydroxyphenyläthanol (MHPE) bzw. in Vanillinmandelsäure (VMA) und Methoxyhydroxyphenylglykol (MHPG) oder MHPG-Sulfat dehydriert. Nach Meek und Neff (1972) sowie Korf et al. (1973) sind MHPG und MHPG-SO_4 die Hauptmetabolite des NA, und nach Rutledge und Jonason (1967) HVA das hauptsächliche Abbauprodukt des DA.

Der andere Teil der KA wird ebenso wie 5-HT nach der Oxydation durch MAO zu ihren entsprechenden Säuremetaboliten dehydriert, und zwar entsteht aus NA 3,4-Dihydroxymandelsäure (DMA) und aus DA 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC). Diese werden dann weiter von der KOMT in VMA und HVA übergeführt.

1.4.2. IHRE LOKALISATION UND FUNKTION

Serotonin ist bekannt als Transmitter der Neuronen, die in der Hauptsache von den Raphe-Kernen des Hirnstammes ausgehen (Dahlström and Fuxe, 1964) und in verschiedenen Strukturen des Rückenmarks und des ZNS, wie dem ventralen Horn und den lateralen Säulen des Rückenmarks, der Hirnrinde, dem Hypothalamus, dem Hippocampus etc. (Fuxe, 1965) enden.

Diese neuronalen Systemespielen eine Rolle in der Regulierung des Schlafes (Jouvet, 1969), der Körpertemperatur (Feldberg and Lotti, 1967), des "reward and punishment" Systems (Stein, 1971), der spinalen monosynaptischen Reflexe (Andersson and Shibuya, 1966) und des Muskeltonus (Alhlman et al., 1971).

Die Katecholamine sind als Transmitter der Neuronen bekannt, die von mehr lateralen Kernen des Hirnstammes ausgehen, wie dem Locus coeruleus, den retikularen Kerngebieten und der Substantia nigra (Dahlström and

Fuxe, 1964) und sich in verschiedene Strukturen wie in die ventralen und lateralen Säulen des Rückenmarks, den Hypothalamus, in die Amygdala und andere Teile des limbischen Systems, in das Neostriatum, den cerebellaren und cerebralen Cortex verteilen. Die Funktion dieser Systeme ist mit der Kontrolle des Schlafes (NA, Jouvet, 1969), der motorischen Aktivität (DA, Papeschi, 1972), der Körpertemperatur (NA, Feldberg and Lotti, 1967), des Blutdruckes (Bolme et al., 1973), des "reward and punishment"-Systems (NA + DA, Stein, 1971; Anlezark et al., 1971) und der spinalen Reflexe (Andén et al., 1966) verbunden.

Auch Krankheiten, wie Schizophrenie, Depression, Epilepsie und Parkinsonismus können Änderungen in Transport, Speicherung, Freisetzung oder postsynaptischer Aktivität dieser Monoamine hervorrufen (Kluge, 1974). Es wird versucht, die dadurch beeinflussten Funktionen mit Hilfe von Psychopharmaka, die auf den Stoffwechsel der BA wirken, wieder zu regulieren (siehe Übersichtsarbeit Sulser and Sanderbush, 1971).

1.4.3. IHRE BEZIEHUNGEN ZU SUBZELLULÄREN STRUKTUREN UND ZUR NERVENFUNKTION

Abbildung 3 zeigt die einzelnen Schritte im Stoffwechsel der BA am Beispiel des DA in Beziehung zu den subzellulären Strukturen und zu den Vorgängen, die während der Nervenfunktion auftreten. Das gleiche gilt auch für NA

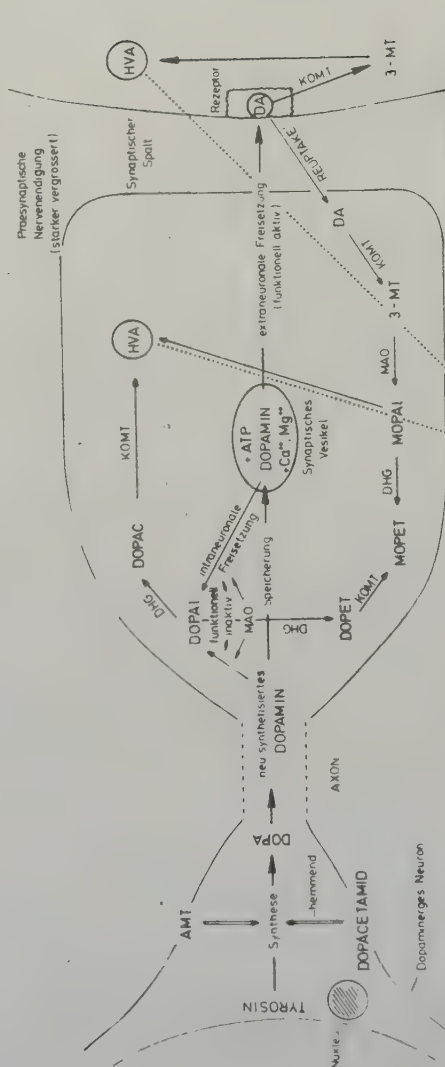
und 5-HT, ausgenommen der spezifischen Unterschiede in ihren metabolischen Bahnen (wie es in Abb. 2 gezeigt ist) und der Lokalisation in anderen neuronalen Systemen.

Das Amin wird im Zellkörper synthetisiert und wandert zum größten Teil durch das Axon in die präsynaptische Nervenendigung. Hier wird das neu synthetisierte Amin in die synaptischen Vesikel (oder Granula) aufgenommen und gespeichert, wo es, an ATP und Mg- und Ca-Ionen gebunden (Da Prada et al., 1971), weitgehend gegen den intraneuronalen Katabolismus geschützt ist. Diese granuläre Speicherung ist jedoch auch die Voraussetzung dafür, daß das Amin durch den Nervenimpuls freigesetzt werden kann (Häggendahl and Malmfors, 1969; Andén et al., 1969 a). Ist es von der Nervenendigung freigesetzt, verbindet es sich mit dem Rezeptor der postsynaptischen Effektorzelle und wird somit funktionell aktiv. Nach der Rezeptorstimulierung muß die Überträgersubstanz wieder inaktiviert werden; diese Inaktivierung zu den Säure- und Alkoholmetaboliten verläuft bei den KA nach zwei Mechanismen: 1. über die KOMT außerhalb der Nervenendigung im synaptischen Spalt oder in dem postsynaptischen Neuron; 2. über einen aktiven "Reuptake" (Wiederaufnahme) in die präsynaptische Nervenendigung (Andén et al., 1969 a; Carlson, 1970). Hier wird die Inaktivierung neben geringfügigem Reuptake in die Vesikel in der Hauptsache von den Enzymen KOMT, MAO und Dehydrogenasen (DHG) beendet. Die Wirkung des 5-HT am Rezeptor wird nur durch den Reuptake in die präsynaptische Nervenendigung beendet.

UMSATZ DES DOPAMINS IN BEZIEHUNG ZU SUBZELLULÄREN STRUKTUREN UND ZUR NERVENFUNKTION SOWIE MÖGLICHKEITEN ZU SEINER BESTIMMUNG

ZNS

Postsynaptisches
Neuron



FREIE DIFFUSION

LIQUOR

AKTIVER TRANSPORT
aus dem ZNS und LIQUOR

TOTALE TURNOVER RATE

(funktionell aktiver + funktionell inaktiver Pool)

DOPAC, DOPET, MOPET, HVA

PROBENECID
hemmend

Abb. 3:

Die Abbildung zeigt ein schematisiertes Bild der Strukturen und Systeme, in denen Dopamin (als Beispiel für die biogenen Amine), sowie seine Vorstufen und Metabolite im Gehirn gefunden werden. Im ZNS sind ein Neuron mit einer Nervenendigung, dem synaptischen Spalt und einem benachbarten postsynaptischen Rezeptor dargestellt. Die Nervenendigung ist im Verhältnis zum Zellkörper stark vergrößert gezeichnet, das Axon ist nur angedeutet. In normaler Funktion verläuft der Umsatz des Dopamins von der Synthese im Zellkörper und der Speicherung in den synaptischen Vesikeln der Nervenendigungen über die extraneuronale Freisetzung und die Stimulierung des Rezeptors zum Abbau in seinen Hauptmetaboliten im postsynaptischen Neuron. Die Metabolite diffundieren frei aus dem ZNS in den Liquor, aus welchem vor allem HVA aktiv in den Blutkreislauf transportiert wird. Der Umsatz wurde durch die Blockierung dieses aktiven Transportes mit Probenecid oder der Synthese mit AMT oder Dopacetamid bestimmt.

Abkürzungen:

AMT	Alphamethyl-p-tyrosin	DOPET	Dihydroxyphenyläthanol
ATP	Adenosintriphosphat	HVA	Homovanillinsäure
DA	Dopamin	KOMT	Katecholorthomethyltransferase
DHG	Dehydrogenase	3-MT	3-Methoxytyramin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin	MAO	Monoaminoxidase
DOPACET-	Alphapropyldopacetamid	MOPAL	Methoxyhydroxyphenylaldehyd
AMID	Dihydroxyphenyllessigsäure	MOPET	Methoxyhydroxyphenyläthanol
DOPAC		ZNS	Zentralnervensystem
DOPAL	Dihydroxyphenylaldehyd		

Unter bestimmten Bedingungen (z. B. unter der Wirkung einer zellfremden Substanz) wird ein Teil des Transmitters ausschließlich intraneuronal abgebaut, ohne über die extraneuronale Freisetzung aus den Vesikeln funktionell aktiv gewesen zu sein. In diesem Fall greift die MAO direkt das neusynthetisierte oder intraneuronal aus den Vesikeln freigesetzte Amin an, welches dann auch nur intraneuronal weiter katabolisiert wird. Es sind demnach zwei verschiedene Pools eines neusynthetisierten Amins vorhanden, einer funktionell aktiv, der andere funktionell inaktiv. Beide Pools enden in den gleichen Hauptmetaboliten, in dem dargestellten Beispiel des Dopamins in HVA, bei Serotonin in 5-HIAA und bei Noradrenalin in MHPG oder MHPG-SO₄ und geben somit die totale Turnover-Rate des entsprechenden Amins an. Diese Endmetabolite werden schließlich über ein aktives Transportsystem aus dem ZNS und Liquor in das Blut befördert.

Eine solche Trennung in funktionell aktive und funktionell inaktive Pools, welche Graham-Smith (1974) bereits für 5-HT vorgeschlagen hatte, ergab sich auch aus der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit.

1.4.4. MÖGLICHKEITEN ZUR BESTIMMUNG IHRES UMSATZES

Wenn nun irgendein Schritt in dieser Kette vollständig blockiert wird, kann die Stoffwechselrate der Monoamine aus der Anhäufung der Substanz vor der Blockade oder aus

der Verringerung des Produkts nach der Synthesehemmung abgelesen werden (Abb. 3). In den folgenden Versuchen wurde der Umsatz (Turnover) der BA einerseits durch Blockade des aktiven Transportes ihrer sauren Metabolite in die Blutbahn mit Probenecid, andererseits durch Hemmung der Tyrosinhydroxylase mit Alphamethyltyrosin (AMT), bzw. der Tryptophanhydroxylase mit Alpha-propyldopacetamid (Dopacetamid) (Costa and Neff, 1966; Andén et al., 1969) bestimmt.

Andere Methoden zur Bestimmung des Umsatzes der BA sind die Messung ihrer Akkumulationsrate nach der Blockade ihres Abbaus mittels MAO-Inhibitoren, wie z. B. Pargylin (Costa and Neff, 1966), oder die Messung der Umwandlungsrate radioaktiv markierter Aminvorstufen (Tyrosin und Tryptophan) in die radioaktiven Amine NA, DA und 5-HT (Sedvall et al., 1968).

Diese Methoden sind hier nur zum Verständnis einiger Befunde erwähnt, die über Veränderungen im Turnover der BA berichten. Sie wurden in dieser Arbeit nicht angewendet, auf ihre Vor- und Nachteile wird in der Diskussion eingegangen.

1.5. BISHERRIGE BEFUNDE ÜBER DEN EINFLUSS VON MORPHIN AUF DEN STOFFWECHSEL DER BIOGENEN AMINE

Eine Reihe von Befunden zeigt, daß Morphin einerseits den Stoffwechsel der BA im Gehirn beeinflußt (Smith,

1972; Way and Shen, 1971), andererseits sich durch Manipulation des Transmitterhaushaltes die Wirkung des Morphins verändern läßt (Ho et al., 1972; Way, 1973; Reinhold et al., 1973; Bläsigg et al., 1973; Herz et al., 1974). Eine Übersicht darüber gibt auch die Arbeit von Herz und Bläsigg (1974), in welcher noch weitere neurobiologische Aspekte der Morphinwirkungen erörtert sind.

Frühere Ergebnisse über die Beeinflussung des Aminhaushaltes durch Morphin basieren meist auf steady state-Bestimmungen, d. h. einfachen Konzentrationsmessungen, von BA. Solche Untersuchungen können jedoch zu falschen Interpretationen führen, denn die Grundkonzentration eines Transmitters kann unverändert sein, auch wenn seine Synthese oder sein Katabolismus erhöht oder erniedrigt sind. Sie ist das Resultat seiner Syntheserate, welche normalerweise seine Inaktivationsrate auszugleichen hat. Dies wurde auch von Valzelli, Giacalone und Consolo (1973) bestätigt, nachdem sie verschiedene Ratten- und Mäusestämme in dem Gehalt und der Umsatzrate ihrer Neurotransmitter verglichen hatten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit ausschließlich Umsatzbestimmungen durchgeführt und auch bei den im folgenden aufgeführten Untersuchungen über die Wirkung akuter und chronischer Morphinverabreichung auf die serotonergen und katecholaminergen Systeme stehen die Umsatzbestimmungen der Amine im Vordergrund.

Die Befunde von Gunne et al. (1969) zeigten, daß DA im Gehirn von Ratten aus dopaminergen Nervenendungen nach einer Injektion von Morphin (20 mg/kg) und nach Hemmung der Katecholaminsynthese mit AMT beschleunigt freigesetzt wird. Kuschinsky (1973) konnte diesen Befund nach einer Dosis von 10 mg/kg akut verabreichtem Morphin im Striatum von Ratten bestätigen. Eine gesteigerte Dopaminsynthese, gemessen nach Inkubierung mit markiertem Tyrosin, konnte im Striatum von Ratten nach akuter Morphingabe nachgewiesen werden (Clouet and Ratner, 1970; Puri et al., 1973). Mit der gleichen Methode stellte Smith (1972) einen erhöhten Turnover von DA und NA im Gehirn von Mäusen fest. Fukui und Takagi (1972) berichteten von einer Steigerung der Konzentration der Dopaminmetaboliten 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure (DOPAC) und HVA . Eine mögliche Ursache für die Konzentrationssteigerung kann in einer Zunahme des Aminosatzes gesehen werden (Fukui et al., 1972).

Eine Steigerung des Serotoninumsatzes wurde bei Ratten nach einmaliger Applikation von Morphin in Dosierungen von 16 mg/kg (Yarbrough et al., 1971), von 20 mg/kg (Goodlet and Sugure, 1972) und von 30 mg/kg (Haubrich and Blake, 1973) festgestellt. Dabei wurde der Umsatz durch Akkumulation der 5-HIAA nach Probenecid, und von den ersten Autorengruppen auch nach Hemmung der MAO durch Pargylin bestimmt. Einen gegenteiligen Befund berichteten Way und Shen (1971); selbst nach einer Dosis von 100 mg/kg Morphin fanden sie keine Änderung in der Syntheserate von 5-HT im Hirn von Mäusen.

Ebenso wie nach einmaliger Applikation zeigen sich auch nach chronischer Gabe von Morphin komplexe Veränderungen im Stoffwechsel der BA. So fanden Clouet und Ratner (1970) einen erhöhten Umsatz des DA und NA nach wiederholten Injektionen von Morphin. Dabei steigerten sie die Dosis während zehn Tagen bis zu 60 mg/kg. Wie in ihren akuten Versuchen bestimmten sie auch hier die Umwandlungen von ^{14}C -Tyrosin in ^{14}C -DA und ^{14}C -NA im Striatum von Ratten. Dagegen wurde bei Mäusen nach wiederholter Morphingabe beobachtet, daß sich Toleranz gegenüber einem erhöhten Umsatz der KA (Smith et al., 1970, 1972) und des DA (Fukui and Takagi, 1972) entwickelte. Kein Unterschied im Aminumsatz zwischen morphinabhängigen Ratten und Kontrollen konnten von Gunne et al. (1969) für DA und von Neal (1968) für NA festgestellt werden. Neal bestimmte den Umsatz mittels der Umsetzung von ^3H -NA in seine ^3H -desaminierten Metabolite.

Nach wiederholten Injektionen oder Pelletimplantationen zur Erzeugung der Morphinabhängigkeit fanden einige Autoren eine deutliche Steigerung des Serotoninumsatzes (Way, Loh and Shen, 1968; Shen, Loh and Way, 1969; Ho, Lu, Stolman, Loh and Way, 1972) bei Mäusen. Einige vergleichbare Ergebnisse erhielten Maruyama und Takemori (1971) bei der gleichen Tierspezies ebenso wie Haubrich und Blake (1973) bei Ratten. Zahlreiche andere Forscher konnten diese Befunde weder bei Mäusen (Cheney et al., 1971; Cheney and Goldstein, 1971; Marshall and Graham-Smith, 1970) noch bei Ratten (Algeri and Costa, 1971; Yarbrough et al.,

1973) bestätigen.

Diese Befunde sind außerordentlich widersprüchlich und lassen die Frage offen, nach welchen biochemischen Mechanismen die durch akute und chronische Morphingabe bewirkten Veränderungen im Stoffwechsel des Serotonins und der Katecholamine zustandekommen. Ebenfalls wurde nicht geklärt, ob diese Stoffwechselveränderungen ursächlich mit den pharmakologischen Wirkungen des Morphins verknüpft sind.

2. P R O B L E M S T E L L U N G

Die Widersprüche der oben angeführten Befunde könnten möglicherweise auf 1. Speziesunterschiede, 2. auf unterschiedliche Methoden zur Umsatzbestimmung der BA, 3. auf unterschiedliche Analysenmethoden zur quantitativen Erfassung der BA, und 4. auf unterschiedliche Grade der zugrundeliegenden Morphinabhängigkeit zurückzuführen sein.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, diese Diskrepanzen durch einen Vergleich verschiedener Umsatzbestimmungs- und Analysenmethoden der BA zu klären und dadurch zu einem besseren Verständnis der neurochemischen Mechanismen der Morphinwirkungen zu kommen. Dabei wurden alle Versuche an einer Tierspezies, der Ratte, durchgeführt; die Morphinzufuhr wurde nach dem unter 1.2. beschriebenen Schema standardisiert.

Das andere und hauptsächliche Ziel ist die Klärung der Frage: Besteht zwischen den durch die Morphingabe bewirkten Veränderungen im Umsatz des Serotonins und der Katecholamine und den pharmakologischen Wirkungen dieses Alkaloids ein ursächlicher Zusammenhang? Dazu wurde versucht, die Veränderungen im Transmitterverbrauch sowohl mit verschiedenen hohen akuten Morphindosen als auch mit unterschiedlichen Graden von Abhängigkeit zu korrelieren.

3. M E T H O D E N

3.1. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DES STOFFWECHSELS DER BIOGENEN AMINE

3.1.1. BLOCKIERUNG DES AKTIVEN TRANSPORTES DER SÄURE- UND ALKOHOLMETABOLITE AUS DEM ZENTRALNERVENSYSTEM UND LIQUOR

Nicht jeder Anstieg in der Synthese der BA ist mit einem Anstieg ihres funktionell aktiven Umsatzes gleichzusetzen; es kann sich vielmehr auch nur eine Erhöhung eines funktionell inaktiven Umsatzes darin widerspiegeln. Zu einer Unterscheidung ist es also notwendig, zum einen die Syntheserate des gesamten Aminpools, zum anderen dessen funktionell aktiven und inaktiven Anteil getrennt zu bestimmen. Eine solche differenzierte Umsatzbestimmung ist nur unter Anwendung verschiedener Methoden möglich, welche im folgenden beschrieben sind.

Die Syntheserate wurde mit der Probenecidmethode bestimmt, mit welcher die gesamte Menge der Aminmetabolite erfaßt wird, unabhängig ihrer Herkunft von Abbauprozessen innerhalb oder außerhalb des Neurons oder von verschiedenen Aminpools (Abbildung 3).

Probenecid (p-Di-n-propylsulfamoylbenzoesäure = Benemid, Merck) ist ein kompetitiver Hemmer des aktiven Säuretransportes aus den Zellen der Nierentubuli und soll dabei auf die Bildung eines Zwischenkomplexes wirken. Ebenso kann das für den Austritt der Säuremetabolite aus dem Gehirn verantwortliche aktive Transportsystem mit Probenecid gehemmt und somit die Menge der Säuremetabolite HVA und 5-HIAA und des sauer reagierenden Sulfates des MHPG, welche im Hirn gebildet wurden, bestimmt werden (Korf and Van Praag, 1971; Meek and Neff, 1972). Neff, Tozer und Brodie (1967) zeigten, daß die Akkumulationsrate von 5-HIAA nach Probenecid gleich der Syntheserate von 5-HT und 5-HIAA in normalen und mit Reserpin behandelten Ratten ist. Sie ist für alle drei Metabolite, die 5-HIAA, die HVA und das MHPG-SO₄ für mindestens 90 Minuten linear. Wilk und Zimmerberg (1973) schließen einen anderen Weg für den Metabolismus der BA sowie eine andere Verteilung der Säuren aus.

Nach der Probenecid-Methode wurde den Ratten in den akuten Experimenten Morphin in verschiedenen Dosierungen 30 Minuten vor Probenecid injiziert und die Akkumulation der HVA, 5-HIAA und des MHPG-Sulfates im Gehirn zu verschiedenen Zeiten nach der Probenecid-Injektion bestimmt und als

Index für den totalen Turnover der entsprechenden Monoamine genommen. In den chronischen Experimenten erfolgte die Injektion des Probenecids jeweils 24, bzw. 72 Stunden nach der letzten Morphin-Pelletimplantation oder eine halbe Stunde nach der letzten Injektion, wenn die Tiere durch wiederholte Morphininjektionen abhängig gemacht wurden.

3.1.2. HEMMUNG DER TRYPTOPHAN- UND TYROSINHYDROXYLASE

Sowohl die Tyrosin- als auch die Tryptophanhydroxylase katalysieren im Zytoplasma die Umwandlung des Tyrosins zu DOPA, bzw. des Tryptophans zu 5-HTP (Abb. 2) unter Benutzung von Sauerstoff und des Kofaktors Tetrahydrofolsäure als Elektronenquelle (Lovenberg and Victor, 1974). Diese geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Aminosynthesen können mit AMT oder Dopacetamid gehemmt werden (Abb. 3).

Die Aminosäure Alphamethyltyrosin (AMT) blockiert die Tyrosinhydroxylase, indem sie mit der Aminosäure Tyrosin um den reduzierten Kofaktor konkurriert (Spector et al., 1965; siehe auch die Übersichtsarbeit von Moore and Dominic, 1971). Anstelle der schwerlöslichen Aminosäure AMT wurde ihr leichtlösliches Methylesterhydrochlorid (H44/68) verwendet. Der Methylester wird in vivo durch Esterasen wieder in die Aminosäure hydrolysiert (Corrodi and Hanson, 1966).

Dopacetamid (H22/54) blockiert beide Hydroxylasen (Carlson et al., 1963; Andén, 1974). Hierbei antagonisiert das Amid die Enzyme durch Konkurrenz mit ihrem Kofaktor (Koe, 1971).

Nach der Synthesehemmung wird die Gesamtkonzentration der Monoamine auf zwei Wegen vermindert: 1. durch extraneuronale Freisetzung der gespeicherten Amine aus den Vesikeln der Nervenendigung und darauffolgendem enzymatischen Abbau (funktionell aktiver Pool) und 2. durch intraneuronale Freisetzung der Amine, d. h. ihren Ausfluß aus den Vesikeln in das Zytoplasma, wo sie durch die MAO abgebaut werden können (funktionell inaktiver Pool). Der gesamte Verlust wird normalerweise durch Neusynthese ausgeglichen, doch nach der Synthesehemmung ist er in dem Absinken der Monoaminkonzentration zu erkennen. Unter normalen Umständen, d. h. in Kontrollratten, wird die zweite Möglichkeit des Aminverlustes jedoch kaum von dem Nervenimpuls beeinflusst, so daß die Gesamtmenge der entleerten vesikulären Amine der funktionellen Aktivität der entsprechenden Neurone proportional gesetzt werden kann (Andén et al., 1969; Weiner et al., 1972).

Zur Bestimmung des funktionell aktiven Umsatzes der BA und zur Unterscheidung von einem eventuell vorhandenen, funktionell inaktiven Anteil wurden die folgenden Methoden der Synthesehemmung angewandt:

1. Die "konventionelle" KA-Synthesehemmungsmethode von Costa und Neff (1966). Nach dieser Methode wurde Morphin

in den akuten Experimenten in einem gleichbleibenden Intervall (30 Minuten) vor AMT, also vor der Synthesehemmung, injiziert und die Konzentration von DA und NA in verschiedenen Zeitabständen nach der Applikation von Morphin und AMT gemessen. Diese Methode ist jedoch nicht einfach zu interpretieren, wenn sie alleine in Turnover-Untersuchungen benutzt wird. Denn hat die zu untersuchende Substanz alleine, ohne AMT, eine Wirkung auf die Grundkonzentration der KA, dann kann dieser KA-Spiegel zu den verschiedenen Zeitpunkten, an denen die einzelnen Tiergruppen getötet werden, verändert sein. Man müßte also, da dies bei Morphin der Fall ist, dessen Wirkung auf die Grundkonzentration der KA berücksichtigen und die Entleerrungsrate nach AMT damit korrigieren. Doch darüberhinaus ist es mit diesem Verfahren nicht möglich, die Wirkung des Morphins bei freier Synthese der KA (d. h. vor AMT) von derjenigen bei blockierter Synthese (d. h. nach AMT) zu unterscheiden; denn, wie bereits erwähnt, können gewisse Wirkungen einer Substanz auf die Aktivität der KA unter der ersten Bedingung in Gang gesetzt werden, jedoch nicht mehr unter der letzteren. Aus diesen Gründen wurde die Turnover-Untersuchung vervollständigt durch:

2. die "modifizierte" KA-Synthesehemmungsmethode, nach welcher Morphin in einem stets gleichbleibenden Intervall (in der Mehrzahl der Experimente 1 Stunde, in anderen jedoch auch 1/2 oder 2 Stunden) vor dem Töten der Tiere injiziert wurde, während der Zeitabstand zwischen den AMT-Injektionen und dem Töten der Tiere für jede Gruppe variiert wurde. In dieser experimentellen Anordnung ist die Wirkungs-

dauer des Morphins und folglich seine Wirkung auf die Grundkonzentration der KA keine Variable mehr und die beobachteten Wirkungen auf die Entleerung der KA sind deshalb ausschließlich auf Veränderungen in ihrem Umsatz zurückzuführen. Der hauptsächliche Vorteil dieser Modifikation ergibt sich jedoch daraus, daß Morphin zunächst vor, dann gleichzeitig mit und dann in größer werdenden Abständen nach AMT injiziert wird. Denn nach diesem Injektionsmuster ist es möglich, die Wirkungen des Morphins bei freier Synthese mit denjenigen bei gerade blockierter Synthese und nach der Blockade, mit denjenigen bei einem kontinuierlich abnehmenden Aminpool in den Vesikeln zu vergleichen. Aus den Aminkonzentrationen nach der Blockade kann dann durch Vergleich von Morphin- und Kontrolltieren ersehen werden, ob eine vermehrte, gleichbleibende oder verminderte Freisetzung aus den Vesikeln stattfand, d. h. ob die funktionelle Aktivität verändert war.

3. Die Synthesehemmungsmethode für die KA und 5-HT zusammen, nach welcher Morphin in den akuten Versuchen 15 Minuten vor Dopacetamid gespritzt wurde und die Tiere 90 Minuten nach der Dopacetamidinjektion zur Konzentrationsmessung der Amine getötet wurden. Diese Methode ist analog der konventionellen AMT-Methode.

In den Versuchen mit chronischer Morphinapplikation wurden sowohl Dopacetamid als auch AMT jeweils 24, bzw. 72 Stunden nach der letzten Morphin-Pelletimplantation injiziert.

3.2. METHODEN ZUR TRENNUNG UND QUANTITATIVEN ERFASSUNG DER BIOGENEN AMINE UND IHRER HAUPTMETABOLITE

3.2.1. ÜBERSICHT

Die biogenen Amine und ihre Metabolite müssen zu ihrer Bestimmung zuerst aus dem Gewebe extrahiert werden. Nach verschiedenen, für jede Stoffklasse spezifischen Trennungsverfahren werden sie dann in fluoreszierende Verbindungen übergeführt und können als solche schließlich quantitativ im Nanogrammbereich erfaßt werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den Gang der für die Bestimmung der verschiedenen Verbindungen angewendeten Analysen.

Tabelle 1

ISOLIERUNG AUS DEM GEWEBE

HOMOGENISATION IM SAUREN MEDIUM

ZENTRIFUGATION

(DA, NA, 5-HT, 5-HIAA, HVA, MHPG-SO₄)

TRENNVERFAHREN

EXTRAKTION	ADSORPTION AN Al ₂ O ₃	IONENAUSTAUSCH	
		KATIONISCH	ANIONISCH
(SÄUREN: HVA, 5-HIAA)	(KATECHOLAMINE: DA, NA)	(Amine: DA, NA, 5-HT)	(SÄURE: MHPG-SO ₄)

QUANTITATIVE BESTIMMUNG

BILDUNG EINES FLUOROPHORS DURCH OXYDATION ODER KONDENSATION
MESSUNG IM SPEKTROFLUOROMETER

Der Isolierungsschritt verläuft bei allen Methoden gleich. Die BA und ihre Metabolite können durch Homogenisation im sauren Medium - meist in 0,4 N Perchlorsäure - leicht aus dem Gehirngewebe extrahiert werden. (Diese Verbindungen sind ja auch nicht durch kovalente Bindungen untereinander oder an andere Moleküle (Costa et al., 1972), sondern nur durch hydrophobe Wechselwirkungen (Pletscher et al., 1970) im Neuron gebunden.) Die durch die Säure ausgefällten Proteine werden durch Zentrifugation bei 20.000 bis 30.000 g vollständig von den Aminen, bzw. Säuren und Alkoholen abgetrennt. Um die jeweils zu bestimmenden Verbindungen anzureichern und sie von anderen mit aus dem Gewebe gelösten Stoffen, wie z. B. Aminosäuren zu trennen, werden im nächsten Schritt unterschiedliche Separationsmethoden angewandt, die alle auf der ungleichen Verteilung der Substanzen in verschiedenen Phasen beruhen.

Zur Abtrennung der Säuremetabolite, HVA und 5-HIAA, erwies sich die Extraktionsmethode am geeignetsten. In dieser Methode gehen die Phenolkarbonsäuren bei pH 1 durch Ausschütteln mit einem organischen Lösungsmittel in die organische Phase über. Im Alkalischen werden sie dann durch Rückschütteln angereichert. Eine Separation der Amine mit dieser Methode erbrachte eine zu geringe Ausbeute mit einer starken Streuung. Deshalb wurde für die gemeinsame Bestimmung der drei Amine DA, NA und 5-HT eine Ionenaustauschmethode und zum Vergleich mit dieser für die

Katecholamine DA und NA auch eine Adsorptionsmethode an Aluminiumoxyd angewandt. Bei der Ionenaustauschmethode wurden bei der Elution Substanzen mit eluiert, die zu Quencheffekten bei der fluorometrischen Bestimmung führen konnten. Die Adsorption der KA an Aluminiumoxyd erbrachte eine bessere Trennung. Hierbei werden bei pH 8,3 die KA und die Phenolkarbonsäuren, jedoch nicht die Metanephrine adsorbiert (Weil-Malherbe, 1964). Die KA können anschließend mit verdünnter Perchlorsäure desorbiert werden. Die Phenolkarbonsäuren sind nur mit stärker konzentrierter Säure eluierbar. Die Säure MHPG-SO₄ konnte als Anion gut auf einer Sephadexharzsäule isoliert werden.

Nach diesen Gruppentrennungen werden die einzelnen Substanzen zu ihrer quantitativen Erfassung in fluoreszierende Verbindungen übergeführt. Zwar besitzen die meisten organischen Verbindungen eine native Fluoreszenz, doch konnte diese mittels Oxydation mit Jod oder Kaliumferricyanid oder Kondensation mit Äthylendiamin oder Orthophthalaldehyd gesteigert werden. PH-Veränderungen dienen dabei zur Trennung von Verbindungen ähnlicher Struktur und daraus resultierender überlappender Fluoreszenz (Williams and Bridges, 1964). Die so entstandenen Fluorophore wurden im Anregungsmaximum im Spektrofluorometer zur Fluoreszenz gebracht und im Fluoreszenzmaximum gemessen. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes.

Da Adsorbentien wie Aluminiumoxyd und Pufferchemikalien oder organische Extraktionsmittel einen Quencheffekt auf die Fluoreszenz haben und mit Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien und Glaswaren zu rechnen ist, wurde bei allen Analysen mit Blindproben gearbeitet. Eine solche Gewebeblindprobe wurde nach der gleichen Methode und mit den gleichen Reagenzien wie die Proben behandelt, die Reagenzien wurden jedoch in umgekehrter Reihenfolge zugegeben. So lief zu jeder Probe eine Blindprobe mit und nach Subtraktion dieses Wertes ergab sich der eigentliche Gehalt. Bei jedem Experiment wurde eine standardisierte Menge der zu bestimmenden Substanz von Anfang der Analyse an mitgeführt, indem sie einer Hälfte des Homogenisates oder einem adäquaten Volumen Perchlorsäure zupipettiert wurde. Durch das Mitführen eines solchen internen Standards (IS) konnte der Verlust der entsprechenden Substanz während des Analysenganges ermittelt werden. Um den Effekt störender Substanzen auf die Oxydation oder Kondensation oder auf die Fluoreszenz zu erfassen, wurde nach dem Trennungsgang eine festgesetzte Menge der zu bestimmenden Substanz (externer Standard = ES) in die gleiche Volumenmenge der jeweiligen Reaktionslösung gegeben. Somit konnten durch Vergleich der internen und externen Standarde abzüglich ihrer Blindproben die Ausbeute (Recovery) jeder Analyse berechnet werden. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Recovery konnten unterschiedliche Verluste bei den einzelnen Analysen korrigiert werden. Außerdem wurde darauf geachtet, daß an jedem Tag die gleiche Anzahl von Gehirnen aus jeder Behandlungs- und Zeitgruppe analysiert wurde, um die

Streuung möglichst niedrig zu halten. So konnten die Ergebnisse der einzelnen Analysentage gut miteinander verglichen werden.

In allen fluorometrischen Bestimmungen wurde in vorhergehenden Eichversuchen die Linearität zwischen Fluoreszenzeinheiten und eingesetzter Menge an internen Standards geprüft. Bei der HVA lag sie im Bereich von 20 ng bis 500 ng, bei der 5-HIAA und bei DA und NA in der Aluminiumoxyd-methode von 0 bis 1000 ng, bei DA, NA und 5-HT in der Kationenaustauschmethode von 0 - 1200 ng und bei dem MHPG-SO₄ von 50 - 600 ng. Morphin, den internen Standards zugegeben, zeigte bei diesen Bestimmungen in keiner Methode einen Quencheffekt.

3.2.2. EXTRAKTIONSMETHODE ZUR GEMEINSAMEN BESTIMMUNG DER HOMOVANILLINSÄURE UND DER 5-HYDROXY-INDOLESSIGSÄURE

In den Experimenten mit Probenecid wurden die Konzentrationen der HVA und 5-HIAA in denselben Gehirnen nach einer Kombination und Modifikation der Butylacetat-Extraktionsmethode von Giacalone und Valzelli (1966) (bereits von Murphy et al., 1969 modifiziert) und den fluorometrischen Methoden für HVA von Andén et al. (1963) und für 5-HIAA von Korf und Valkenburgh-Sikkema (1969) bestimmt.

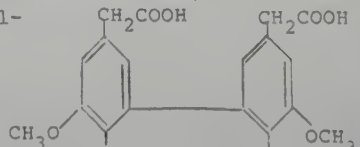
In dieser Extraktionsmethode werden die Säuren, Alkohole und Amine aufgrund ihrer in verschiedenen polaren Phasen unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten getrennt. Eine optimale Verteilung und die daraus resultierende Ausbeute der HVA und 5-HIAA konnte durch Vergleich verschiedener Säuren zur Proteinausfällung sowie verschiedener Lösungsmittel und Puffer erhalten werden.

Nach Andén et al. (1963) wurde die HVA mit 0,1 N HCl aus dem Gewebe extrahiert, in Äthylacetat gelöst und in einen Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)-Puffer übergeführt. Dies erbrachte eine Recovery von 20 %, welche durch die Einführung eines Phosphatpuffers von pH 9 auf 50 - 60 % erhöht werden konnte. Wenn kein Puffer verwendet wurde und das Äthylacetat bis zur vollständigen Trockenheit abgedampft und danach die HVA in 0,01N HCl wieder gelöst wurde, betrug die Wiederfindung auch nur um 50 %.

Murphy et al. (1969) hatten das von Giacalone und Valzelli (1966) bereits für die Extraktion der 5-HIAA verwendete Butylacetat für die Extraktion der HVA und 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure übernommen, doch bei der Rückextraktion der Säuren zogen sie aufgrund eines besseren Verteilungskoeffizienten einen TRIS-Puffer dem von Giacalone und Valzelli benutzten Phosphatpuffer vor. Beide Autorengruppen homogenisierten das Gewebe in Perchlorsäure. Die im folgenden beschriebene Kombination dieser beiden Methoden erbrachte für beide Säuren zusammen eine optimale Ausbeute.

Nach der Gewebehomogenisation und der Proteinausfällung mit 8 ml 0,4 N Perchlorsäure wurde der zentrifugierte Extrakt unter Zusatz von Cystein und Kochsalz mit 25 ml Butylacetat ausgeschüttelt. Durch die Sättigung der wäßrigen Lösung wurde eine bessere Phasentrennung erreicht. Bei diesem ersten Extraktionsschritt gehen die schwachen, bei pH1 ungeladenen organischen Säuren, HVA und 5-HIAA, sowie unpolare Alkohole entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten, in die organische Phase über. Die Amine und Aminosäuren bleiben als Kationen in der sauren wäßrigen Phase. Diese Trennung wurde durch Rückextraktion mit 6,5 ml TRIS aus 4/5 des Butylacetates verstärkt; denn in der jetzt stark alkalischen wäßrigen Phase (pH 10) können die schwachen Phenol- bzw. Indolkarbonsäuren als Ionen in Lösung gehen, während die unpolaren Alkohole in der organischen Phase verbleiben. Zur Unterstützung dieser Trennung mußte die Ionenstärke niedrig gehalten werden. Deshalb wurde eine schwach molare (0,05 M) TRIS-Pufferlösung verwendet.

Aus dem TRIS-Extrakt wurde die HVA nach Andén et al (1963) durch Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat im stark alkalischen Medium (10 N NH_4OH) zu einer stark fluoreszierenden Verbindung oxydiert. Die Stärke der Amoniaklösung wurde bis auf 10 N erhöht, um mitgeschleppte Butylacetatverunreinigungen restlos zu verseifen. Das entstandene Fluorophor wurde von Corrodi und Werdinius (1965) als 2,2'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-diphenyl-5,5'-diessigsäure identifiziert. Diese Reaktion wurde



nach vier Minuten von dem Reduktionsmittel Cystein gestoppt. Weder das Hexacyanoferrat noch das Cystein störten das nach 20 Minuten folgende Ablesen der Fluoreszenz (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{max.}} = 320 \text{ nm}$, Fluoreszenzwellenlänge $\lambda = 422 \text{ nm}$) dieses Dehydrodimerisates. Zum Schutz der aromatischen Ringverbindungen vor Oxydation wurde das Cystein der von Andén et al. (1963) verwendeten Ascorbinsäure vorgezogen, da diese einen Teil des Anregungslichtes absorbierte.

Die Fluoreszenz der 5-HIAA wurde nach Valkenburgh-Sikkema (1969) durch Zugabe von 2 ml kon. HCl aus 1 ml des TRIS-Extraktes entwickelt und nach Oxydation mit Natriummetaperjodat mit 0,1 ml einer 0,1 %igen methanolischen Orthophthalaldehydlösung (OPT) noch verstärkt. Nach Maickel und Miller (1966) kann die Eigenfluoreszenz aller im C-Atom 5 substituierten Indole durch Kondensation mit OPT erhöht werden. Zur Vervollständigung der Kondensation wurde die Lösung zum Sieden erhitzt und ihre Fluoreszenzintensität nach dem Abkühlen mit einer Wellenlänge von 356 nm angeregt und bei 422 nm spektroskopisch bestimmt. Auch bei dieser Reaktion wurde der empfindliche Indolring durch vorherige Zugabe einer 1 %igen Cysteinlösung geschützt. Die Intensität der Fluoreszenz konnte in beiden Fällen durch eine Verringerung des Volumens der Reagentien und eine Erhöhung des Volumens der Proben noch etwas gesteigert werden. Mit der auf diese Weise modifizierten Methode lag die Recovery bei $85 \pm 10 \%$ für HVA und bei $75 \pm 10 \%$ für 5-HIAA.

3.2.3. ADSORPTIONSMETHODE MIT ALUMINIUMOXYD ZUR GEMEINSAMEN BESTIMMUNG VON DOPAMIN UND NORADRENALIN

In den Experimenten mit der konventionellen oder modifizierten KA-Synthesehemmungsmethode mit AMT wurden die Konzentrationen des DA und NA im Gehirn einer Ratte nach einer Kombination und Modifikation der Aluminiumadsorptionsmethode nach Anton und Sayre (1962) und der fluorometrischen Methode nach Laverty und Taylor (1968) bestimmt.

Die Gehirne wurden in 0,4 N Perchlorsäure homogenisiert und das Homogenisat zur Abtrennung von Gewebe und Proteinen zentrifugiert.

In dem darauffolgenden Schritt der Adsorption der KA an Aluminiumoxyd wurde in ersten Versuchen nach Anton und Sayre (1962) das Aluminiumoxyd direkt in die noch sauren Überstände des Zentrifugats gegeben und danach diese Mischung direkt mit Natronlauge auf pH 8,6 eingestellt. Ein solches Vorgehen erwies sich jedoch als sehr riskant, da ein zu hoher pH die Amine schnell zerstören konnte. Auch war der Zeitaufwand in diesem ungepufferten System so groß, daß die Analyse an einem Tag nicht beendet werden konnte und die Eluate vor der fluorometrischen Bestimmung eingefroren werden mußten. Dies führte zu einer Verringerung der Recovery der KA. Aus diesem Grund wurde nach Chang (1964) ein 0,5 M Natriumacetatpuffer eingeführt, dessen pH jedoch von 8,6 auf 8,3, das Adsorptionsmaximum, erniedrigt wurde. Die gepufferte Lösung

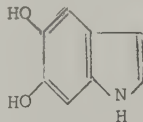
wurde jetzt mit tropfenweiser Zugabe von zuerst 5 N, dann 1 N NaOH unter ständigem Rühren auf pH 8,3 eingestellt.

Die Katecholamine sind gegenüber alkalischen Lösungen sehr empfindlich und werden in Gegenwart von Spuren von Metallionen, wie z. B. Fe^{+++} , leicht oxydiert. Um dies zu verhindern, wurde der Perchlorsäure und dem Acetatpuffer Natriumdisulfit als Antoxydant und EDTA (das Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure) als Metallkomplexbildner hinzugefügt.

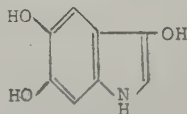
In die so geschützte, schwach basische Lösung wurde jetzt das Aluminiumoxyd gegeben und die neutral vorliegenden KA konnten unter schwachem Schütteln optimal von diesem adsorbiert werden. Das Aluminiumoxyd wurde danach noch zweimal mit H_2O ausgewaschen, um die störenden Substanzen abzutrennen. Die vollständige Trennung von mit-adsorbierten Phenol- und Indolkarbonsäuren erfolgte weiter nach Anton und Sayre durch Elution mit 0,05 N Perchlorsäure. Das Eluat wurde mit einem 0,25 M Phosphatpuffer neutralisiert.

Die fluorometrische Bestimmung der KA erfolgte aus der gepufferten Lösung nach der Methode von Lavery und Taylor (1968), die bereits von Reinhold (1973) in diesem Labor modifiziert wurde. Ein gegenseitiges Überlappen der Fluoreszenzspektren beider Fluorophore konnte durch pH-Veränderungen noch auf 1 - 2 % reduziert werden.

Die KA wurden zuerst mit Jod über Orthochinone als Zwischenprodukte unter Ringschluß zu Adenochromen oxydiert, und die Reaktion nach 3 Minuten in alkalischer Lösung (2,5 N NaOH) mit Natriumsulfit gestoppt. Bei diesem pH-Wert isomerisieren die Hydroxyindolderivate zu den "Lutinen" (Carlsson and Waldeck, 1958). Von dem Reduktionsmittel konnte unter anderem auch eine weitere Oxydation zu Melaninen verhindert werden. Nach weiteren fünf Minuten wurden durch Ansäuern mit Eisessig die beiden folgenden Fluorophore entwickelt: aus DA 5,6 Dihydroxyindol



und aus NA 3,5,6 Trihydroxyindol



Diese in ihrer Struktur sehr ähnlichen Verbindungen konnten aufgrund ihrer pH-abhängigen unterschiedlichen Fluoreszenz einzeln bestimmt werden. Zuerst wurde die Fluoreszenz des Trihydroxyindols bei pH 4,9 bei den Wellenlängen von 396/470 nm im Spektrophotometer gelesen. Danach konnte aus den gleichen Proben durch 40-minütiges Erhitzen bei 100°C und Erniedrigung des pH auf 4,4 die Fluoreszenz des Dihydroxyindols bei den Wellenlängen von 320/360 nm gemessen werden. (Die Acetationen des Eisessigs pufferten den erwünschten pH-Wert). Die Recovery dieser Methode lag für NA bei $80 \pm 10 \%$ und für DA bei $70 \pm 10 \%$.

3.2.4. GEMEINSAME BESTIMMUNG VON DOPAMIN, NORADRENALIN UND SEROTONIN NACH TRENNUNG MIT EINEM SCHWACHEN KATIONEN-AUSTAUSCHER

Um in den Experimenten mit Dopacetamid die Konzentrationen der KA und des 5-HT zusammen aus einem Gehirn und nach einem Trennungungsverfahren bestimmen zu können, wurde die folgende Methode entwickelt.

Nach dem Homogenisieren in 0,4 N Perchlorsäure wurden die wäßrigen Überstände nach Zugabe von 2 ml eines 0,5 M Phosphatpuffers von pH 6,0 mit 5 N und 1 N KOH auf pH 6,0 eingestellt. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert und die Überstände auf eine schwache Kationenaustauschersäule gegeben. In diesen schwach sauren Überständen liegen die Amine als Kationen vor und werden als solche gegen die Kationen der Carboxylgruppe eines Amberliteharzes (CG-50, Type 1) ausgetauscht. Dabei können die niedermolekularen Ionen der Amine durch die feine Gelstruktur des Methacrylsäuredivinylbenzols (Maschenweite 100 - 200, Kerngröße 0,33 - 0,50 mm) diffundieren und bei einem schwach sauren pH (das Harz wurde zuvor mit einem 0,5 M Phosphatpuffer von pH 6,5 gewaschen) durch Adsorption an dessen aktive Gruppen von ihren Vorstufen, den Aminosäuren, und ihren Metaboliten getrennt werden. Diese Trennung wurde durch nochmaliges Waschen der Säulen mit dem 0,5 M Phosphatpuffer und darauffolgendem Eluieren mit 6 ml einer Mischung von 2 N HCl und 96 %igem Äthanol 1:1 vervollkommenet.

Diese Säurekonzentration des Eluats erbrachte die beste Recovery für alle Amine; durch Elution mit stärkerer Säure (3N HCl) entstand ein Quencheffekt in der Fluoreszenz der KA, mit schwächerer Säure (1N HCl) wurde die Recovery des 5-HT erniedrigt.

Die Konzentration des 5-HT wurde dann fluorometrisch in einem Aliquot von 1 ml Eluat nach der in 3.2.2. für 5-HIAA beschriebenen Methode von Korf und Valkenburg-Sikkema (1969) gemessen. Das verbleibende Eluat wurde mit einem 0,5 M Phosphatpuffer auf pH 6,8 eingestellt und die Konzentration von DA und NA fluorometrisch in Aliquots von 1,5 ml nach dem in 3.2.3. beschriebenen Verfahren von Lavery und Taylor (1968) bestimmt.

Auch bei dieser Methode war es wichtig, die Amine durch Zugabe von Antoxydantien, wie Natriumdisulfit und Chelatbildnern, wie EDTA, vor einem vorzeitigen Abbau durch Oxydation zu schützen. Ein solcher Verlust der KA konnte besonders während des Eluierens mit 2 N HCl von zu langen Säulen oder mit zu niedriger Tropfgeschwindigkeit entstehen. Er schwankte, wohl durch die unkontrollierbaren Einflüsse der Metallionen, von Experiment zu Experiment, auch verringerte sich die Recovery nach mehrmaligem Benutzen der gleichen Säulen. Aus diesen Gründen wurden kurze Säulen mit einer nur 5 cm hohen Bepackung des Harzes für jeweils 4 - 5 Bestimmungen angefertigt. Die Fließgeschwindigkeit des Eluates wurde auf 0,5 ml/Min. eingestellt. Wurden die Proben und das Harz auf diese Weise behandelt, so lagen die Wiederfindungsraten des 5-HT bei

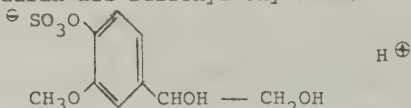
75 $\pm$ 10 % und die der KA um nur 10 % niedriger als in der Al_2O_3 -Methode. Der Vorteil dieser Ionenaustauschmethode gegenüber der Adsorptionsmethode liegt in der Möglichkeit, alle 3 Monoamine gemeinsam aus einem Gewebe bestimmen zu können. Die Reinigungs- und Trennungsschritte dieser Methode waren gegenüber der Adsorptionsmethode etwas aufwendiger und störanfälliger.

3.2.5. BESTIMMUNG DES 3-METHOXY-4-HYDROXY-PHENYLGLYKOLSULFATES NACH ANIONENAUSTAUSCH AUF EINER DEAE SEPHADEXSÄULE

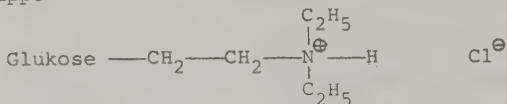
In den Experimenten mit Probenecid wurde die Konzentration des MHPG- SO_4 nach der Trennung auf einer DEAE-Sephadex-A-25-Säule mit der fluorometrischen Methode von Meek und Neff (1972) gemessen.

Die Gehirnproteine wurden durch Homogenisation des Gewebes mit einer 0,2 M Zinksulfatlösung nach Zugabe des gleichen Volumens einer 0,2 M Bariumhydroxydlösung ausgefällt und abzentrifugiert. Nach diesem Verfahren bleiben nur wenige, den darauffolgenden Ionenaustausch störende Ionen zurück. Die Überstände wurden jetzt auf Säulen gegeben, welche 4 cm hoch mit DEAE-Sephadexgel, einem synthetischen Polysaccharid, bepackt waren. In dem dreidimensional verknüpften Raumnetz dieser Polysaccharid(= Dextran) Ketten sind die funktionellen Austauschergruppen über Ätherbrücken an die Glukosebausteine gebunden.

Das MHPG-SO₄ wird darin als Sulfonyl-oxy-anion



mit den Chloridionen der aktiven Diäthylaminoäthylgruppe



des Polysaccharids ausgetauscht.

Neben diesem Ionenaustauscheffekt können noch andere Bindungsmechanismen wie van der Waals'sche Kräfte und polare Wechselwirkungen bei der Trennung wirksam werden. Auf diese Weise konnte das MHPG-SO₄ leicht von den nicht-anionischen Bestandteilen des Gehirngewebes getrennt werden. Die mitadsorbierten Anionen konnten durch Auswaschen mit einer geringer konzentrierten Säure (0,01 N HCl) abgetrennt werden, während das MHPG-SO₄ (Sulfonyloxyanion) erst mit einer stärkeren Säurekonzentration (0,15 N HCl) eluierbar war.

Zur fluorometrischen Bestimmung nach Meek und Neff (1972) wurde das Eluat jetzt mit 0,2 ml einer 1,5 %igen Cysteinlösung und 0,3 ml einer 60 %igen Perchlorsäure im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Aus 2 ml Aliquots des so angesäuerten Eluates wurde durch Kondensation mit Äthylen-diamin eine fluoreszierende Verbindung entwickelt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 328 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 450 nm abgelesen. Diese Methode erbrachte eine Wiederfindungsrate für das MHPG-SO₄ von $72 \pm 8 \%$.

4. E R G E B N I S S E

4.1. AKUTE MORPHINGABE

Eine einmalige Morphinapplikation von 20 mg/kg bewirkte einen Anstieg sowohl der Grundkonzentration als auch der Entleerung nach AMT des DA, zeigte jedoch keine signifikante Wirkung auf NA (Abb. 4); Morphin wurde in diesem Versuch nach der konventionellen Synthesehemmungsmethode in einem gleichbleibenden zeitlichen Intervall (30 Minuten) vor AMT injiziert.

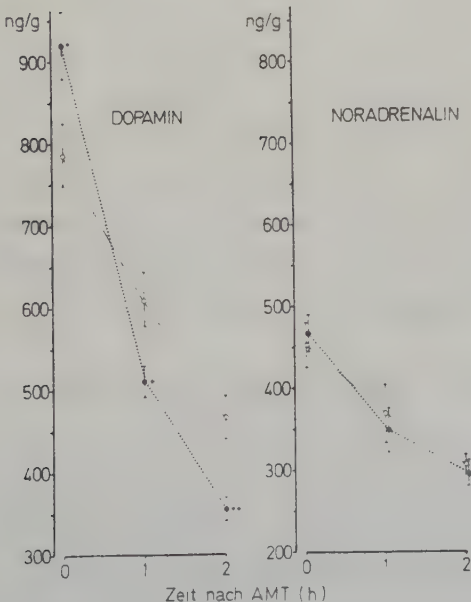


Abb. 4: Wirkung akuter Morphingabe auf die Entleerung der KA im Gehirn nach AMT. Nach der konventionellen Synthesehemmungsmethode wurden Morphin, 20 mg/kg, oder physiologische Kochsalzlösung s.c. 30 Min. vor AMT, 250 mg/kg i.p., injiziert. Die Ordinate gibt die Konzentration des DA und NA in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Stunden nach AMT. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (s) von 6 Ratten.
 ●---● Morphin
 ○---○ physiologische Kochsalzlsg.

* $p < 0,05$; * * $p < 0,01$ von den Kontrollen (Student's t-Test oder Welch-Verfahren)

Wurde es dagegen in derselben Dosierung nach der modifizierten Synthesehemmungsmethode in einem gleichbleibenden Intervall (1 Stunde) vor dem Töten der Tiere injiziert, während der Zeitabstand zwischen AMT und dem Töten variiert wurde, war weder die Grundkonzentration noch die Entleerungsrate beider KA signifikant verändert (Abb. 5). Der Kurvenverlauf der DA-Entleerung ist bei den Morphintieren gegenüber den Kontrollen 1 und 2 Stunden nach der Synthesehemmung leicht erniedrigt; 3 und 5 Stunden nach AMT ist die Senkung beider Kurven, ebenso wie bei NA im gesamten Zeitverlauf, fast identisch. Daß die DA-Entleerung 30 Minuten nach AMT, wenn Morphin also, wie in Abb. 4, 30 Minuten vor AMT injiziert wurde, sich offenbar nicht von der der Kontrollen unterschied, kann damit erklärt werden, daß Morphin bereits zur Zeit der AMT-Gabe die Grundkonzentration des DA erhöht hatte. Die Kurven der Morphin- und Kontrollgruppen sind in Abb. 5 dennoch vom gleichen Punkt aus beginnend gezeichnet, da in diesem Experiment die Wirkung des Morphins alleine nach 30 Minuten nicht gemessen wurde.

In zwei ähnlich wie in Abb. 5 mit der modifizierten Synthesehemmungsmethode durchgeführten Experimenten wurden die Wirkungen des Morphins vor, zusammen mit und nach den AMT-Injektionen noch einmal miteinander verglichen. Lediglich der Zeitabstand zwischen Morphin und dem Töten der Tiere wurde in dem einen Versuch auf eine halbe Stunde verkürzt (Tabelle 2), in dem anderen auf 2 Stunden verlängert (Tabelle 3). Auch hier konnten keine

signifikanten Veränderungen in der Entleerung der beiden KA im Vergleich mit den Kontrollen beobachtet werden.

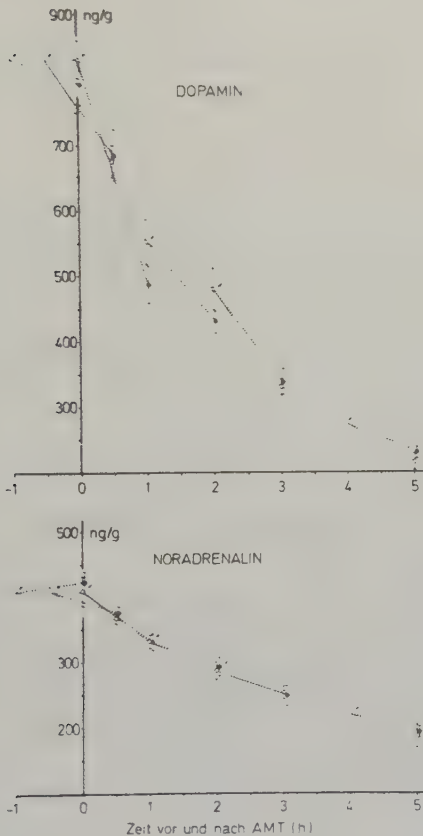


Abb.5: Wirkung akuter Morphingabe auf die Entleerung der KA im Gehirn nach AMT. Nach der modifizierten Synthesehemmungsmethode wurden Morphin, 20 mg/kg s.c., oder physiologische Kochsalzlösung in einem stets gleichbleibenden Intervall (1 Std.) vor dem Töten der Tiere, jedoch in einem veränderten Zeitabstand zu AMT - wie es durch die Pfeile angezeigt ist - injiziert. Die Konzentration der KA wurde zum Zeitpunkt der Morphininjektion nicht gemessen, da angenommen wurde, daß sie zu dieser Zeit derjenigen der Kontrollen entsprach. Die Ordinate gibt die Konzentration des DA oder Na in ng/g an, die Abszisse die Zeit vor und nach AMT in Stunden. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ s von 6 Ratten. ●---● Morphin; o—o physiologische Kochsalzlösung.

Tabelle 2

Wirkung akuter Morphingabe auf die Entleerung der KA im Gehirn. Morphin, 20 mg/kg s.c., oder physiologische Kochsalzlösung wurden nach der modifizierten Synthesemethode, wie in Abb. 5, in einem unterschiedlichen Zeitabstand zu AMT, 250 mg/kg i.p., jedoch jeweils 30 Min. vor dem Töten der Tiere injiziert.

DOPAMIN ng/g ⁽¹⁾							
Zeit nach AMT in Minuten	N	Kochsalz kon- trollen	x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾	
0	6	866 $\pm$ 58	100	942 $\pm$ 47	100	109	
15	6	765 $\pm$ 33	88	768 $\pm$ 53	81,5	100,5	
30	6	577 $\pm$ 32	67	623 $\pm$ 37	66	108	
60	6	570 $\pm$ 28	66	589 $\pm$ 43	63	104	
180	6	437 $\pm$ 16	50	460 $\pm$ 25	49	105	

NORADRENALIN ng/g ⁽¹⁾							
Zeit nach AMT in Minuten	N	Kochsalz kon- trollen	x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾	
0	6	363 $\pm$ 30	100	362 $\pm$ 29	100	100	
15	6	320 $\pm$ 18	88	320 $\pm$ 22	88,5	100	
30	6	296 $\pm$ 20	81	314 $\pm$ 21	87	106	
60	6	287 $\pm$ 20	79	252 $\pm$ 22	70	88	
180	6	212 $\pm$ 18	58,5	219 $\pm$ 20	60	103,5	

(1) Mittelwert $\pm$ s

(2) (Konzentration zur Zeit x / Konzentration zur Zeit 0) x 100

(3) (Konzentration der Morphingruppe / Konzentration der Kontrollgruppe) x 100

Tabelle 3

Wirkung akuter Morphingabe auf die Entleerung der KA im Gehirn. Morphin, 20 mg/kg oder physiologische Kochsalzlösung wurden nach der modifizierten Synthesemmungsmethode, wie in Abb. 5, in einem unterschiedlichen Zeitabstand zu AMT, 250 mg/kg i.p., jedoch jeweils 2 Stunden vor dem Töten der Tiere injiziert.

Zeit nach AMT in Stunden	N	Kochsalz kon- trollen	DOPAMIN ng/g ⁽¹⁾			
			x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾
0	6	760 $\pm$ 58	100	780 $\pm$ 54	100	103
1 1/2	6	660 $\pm$ 45	83,5	620 $\pm$ 53	79,5	94
2	6	402 $\pm$ 37	53	380 $\pm$ 11	49	95
2 1/4	6	382 $\pm$ 27	50	361 $\pm$ 30	46	95
2 1/2	6	306 $\pm$ 23	40	288 $\pm$ 25	37	94
3	6	265 $\pm$ 15	35	250 $\pm$ 18	32	94

Zeit nach AMT in Stunden	N	Kochsalz kon- trollen	NORADRENALIN ng/g ⁽¹⁾			
			x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾
0	6	384 $\pm$ 30	100	378 $\pm$ 44	100	98,5
1 1/2	6	314 $\pm$ 23	82	333 $\pm$ 25	88	106
2	6	236 $\pm$ 19	61,5	219 $\pm$ 19	58	93
2 1/4	6	222 $\pm$ 17	59	226 $\pm$ 16	60	100
2 1/2	6	203 $\pm$ 18	53	192 $\pm$ 20	51	95
3	6	194 $\pm$ 25	50,5	166 $\pm$ 23	40	86

(1) Mittelwert $\pm$ s

(2) (Konzentration zur Zeit x / Konzentration zur Zeit 0)
x 100

(3) (Konzentration der Morphingruppe/ Konzentration der
Kontrollgruppe) x 100

Wurde Morphin 15 Minuten vor der Synthesehemmung mit Dopacetamid, ebenfalls in der Dosis von 20 mg/kg injiziert, waren die Grundkonzentrationen von beiden Katecholaminen, DA und NA erhöht. Doch nur die Entleerung des DA war bei den mit Morphin behandelten Ratten gegenüber denen mit physiologischer Kochsalzlösung Injizierten signifikant beschleunigt (Abb. 6). Serotonin war weder in seiner Grundkonzentration noch in seiner Entleerungsrate signifikant verändert.

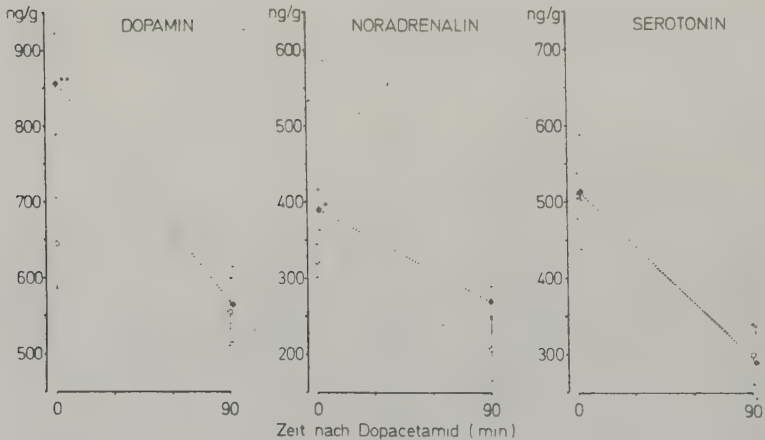


Abb. 6

Wirkung akuter Morphingabe auf die Entleerung der KA und des 5-HT nach Dopacetamid. Morphin, 20 mg/kg, oder physiologische Kochsalzlösung wurden s.c. 15 Min. vor Dopacetamid, 500 mg/kg i.p., injiziert. Die Ordinate gibt die Konzentration des DA, NA oder 5-HT in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Minuten nach Dopacetamid. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ s von 6 - 12 Ratten. ●---● Morphin; ○---○ physiologische Kochsalzlösung

* $p < 0,10$; ** $p < 0,05$ von den Kontrollen (Student's t-Test oder Welch-Verfahren)

In verschiedenen Dosierungen 30 Minuten vor Probenecid appliziert, erhöhte Morphin die Akkumulationsrate der HVA. Diese Wirkung war nach 20 mg/kg am stärksten ausgeprägt. In einer anderen Serie von Experimenten (die Daten sind hier nicht gezeigt) war die Konzentration der HVA nach 40 mg/kg auch ohne den Einfluß des Probenecid erhöht (Abb. 7).

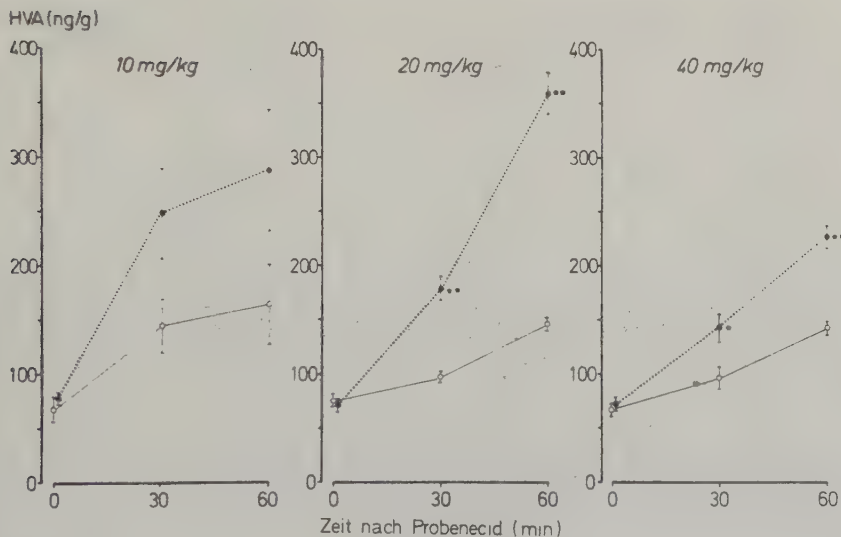


Abb. 7

Wirkung akuter Morphingabe auf die HVA-Akkumulation nach Probenecid. Morphin, 10, 20 oder 40 mg/kg, oder physiologische Kochsalzlösung wurden s.c. 30 Min. vor Probenecid, 200 mg/kg i.p., injiziert. Die Ordinate gibt die Konzentration der HVA im Gehirn in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Minuten nach Probenecid. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ s von 6 Ratten.

●---● Morphin; o—o physiologische Kochsalzlösung

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ von den Kontrollen (Student's t-Test oder Welch-Verfahren)

Bei den gleichen Tieren war die Konzentration der 5-HIAA ohne Probenecid-Einfluß nach 20 mg/kg Morphin erhöht, die durch Probenecid bewirkte Anhäufung war erst nach der 40 mg/kg-Dosis signifikant angestiegen (Abb. 8).

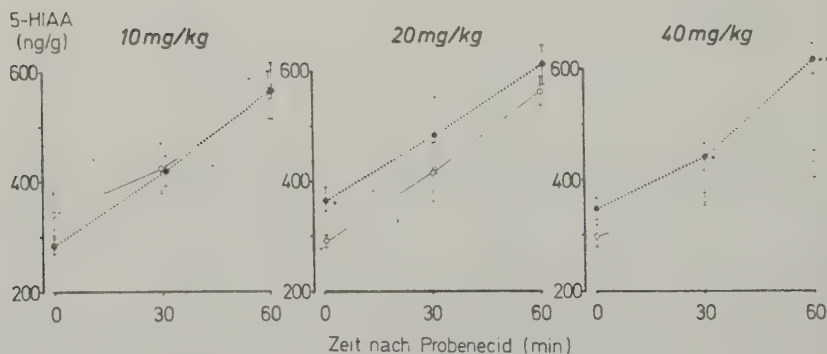


Abb. 8

Wirkung akuter Morphingabe auf die 5-HIAA-Akkumulation nach Probenecid. Weitere Erklärungen siehe Abb. 7.

Die Akkumulation des MHPG-SO₄ wurde von Morphin, welches auch in diesem Versuch 30 Minuten vor Probenecid und gleich in der höchsten Dosierung von 40 mg/kg injiziert wurde, nicht signifikant beeinflusst (Tabelle 4).

Tabelle 4

Wirkung akuter Morphingabe auf die Akkumulation des MHPG-Sulfats nach Probenecid. Morphin, 40 mg/kg, oder physiologische Kochsalzlösung wurden s.c. 30 Min. vor Probenecid, 200 mg/kg i.p., injiziert.

Zeit nach Probenecid {Stunden}	N	Kochsalz- kon- trollen	MHPG-SO ₄ , ng/g ⁽¹⁾			
			x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾
0	6	301 ± 28	100	340 ± 25	100	113
1	6	483 ± 60	160	471 ± 36	139	98
2	6	615 ± 52	204	589 ± 30	173	96

(1) Mittelwert ± s

(2) (Konzentration zur Zeit x / Konzentration zur Zeit o)
x 100

(3) (Konzentration der Morphingruppe / Konzentration der
Kontrollgruppe) x 100

4.2. CHRONISCHE MORPHINGABE

Die Entleerungsrate von DA und NA nach AMT war in Gehirnen von Ratten mittlerer Morphinabhängigkeit (Gruppe 6/10) und in Gehirnen von Placebo-implantierten Tieren nicht verschieden (Abb. 9). In Ratten mit extrem hoher Abhängigkeit (Gruppe 21/9) war die Entleerung der KA leicht verzögert. Diese Tendenz wurde im Falle des NA 2 Stunden nach AMT signifikant (Abb. 10).

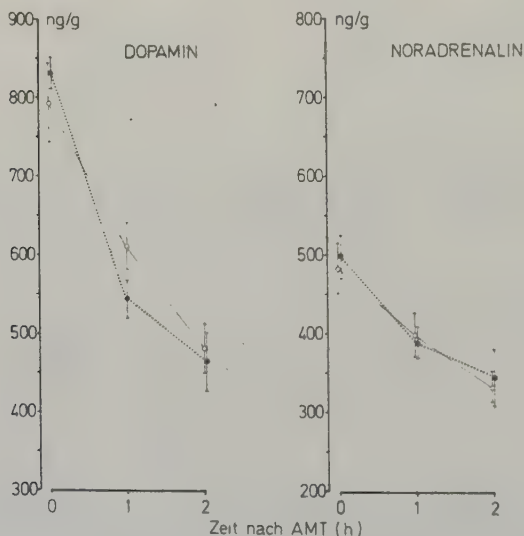


Abb. 9: Entleerungsrate der KA nach AMT im Gehirn von tolerant/abhängigen Ratten (Gruppe 6/10, Implantationsmuster siehe Kap. 1.2. und exp. Teil, Kap. 2). Am letzten Tag der Implantationsperiode wurde AMT, 250 mg/kg i.p. injiziert. Die Ordinate gibt die Konzentration des DA oder NA in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Stunden nach AMT. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert + s von mindestens 6 Ratten. ●—● Morphinpellets; ○—○ Placebopellets.

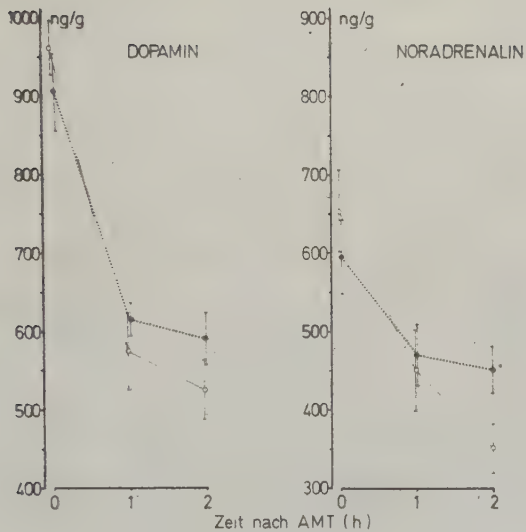


Abb. 10: Entleerungsrate der KA nach AMT im Gehirn von tolerant/abhängigen Ratten (Gruppe 21/9, Implantationsmuster siehe Kap. 1.2. und exp. Teil Kap. 2), Weitere Erklärungen siehe Abb. 9.

■ $p < 0,01$ von den Kontrollen (Student's t-Test)

Wurde der Umsatz der KA und des 5-HT mit der Dopacetamid-Methode in Gruppen mit einem mittleren Abhängigkeitsgrad (Gruppe 6/10 und 27/31) bestimmt, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Entleerungsrate der drei Amine beobachtet werden (Tab. 5).

Tabelle 5

Entleerungsrate der KA und des 5-HT nach Dopacetamid im Gehirn von Ratten mit mittleren (siehe Abb, 1) Abhängigkeitsgraden. Die Tiere beider Gruppen wurden mit Morphin- oder Placebopellets nach dem im experimentellen Teil, Kap. 2, beschriebenen Schema implantiert, wonach bei der 27/31 Gruppe im Unterschied zu der 6/10-Gruppe lediglich die Dauer der Implantationsperiode auf 31 Tage verlängert wurde; am letzten Tag der Implantationsperiode wurde Dopacetamid, 500 mg/kg, i.p., injiziert.

Gruppe 6/10										Gruppe 27/31									
Zeit nach Dopacetamid in Stunden		N	Placebo	x/o ⁽²⁾	D A			Placebo	x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾	M/K ⁽³⁾						
					x/o ⁽²⁾	Morphin	M/K ⁽³⁾												
0	6	732 ± 73	100	732 ± 38	100	100	674 ± 29	100	711 ± 37	100	105								
	3	507 ± 42	69	543 ± 42	74	107	460 ± 28	68	445 ± 45	63	97								
N A																			
0	6	448 ± 19	100	417 ± 51	100	93	616 ± 38	100	615 ± 52	100	100								
	3	244 ± 26	54	215 ± 25	51	88	317 ± 24	53	285 ± 25	46	87								
S - H T																			
0	6	564 ± 53	100	517 ± 49	100	92	486 ± 42	100	505 ± 26	100	104								
	3	393 ± 34	68	308 ± 38	60	80	251 ± 20	52	262 ± 44	52	104								

(1) Mittelwert ± s

(2) (Konzentration zur Zeit x / Konzentration zur Zeit o) x 100

(3) (Konzentration der Morphingruppe / Konzentration der Kontrollgruppe) x 100

Die Akkumulation der HVA und 5-HIAA nach Probenecid im Gehirn von Ratten, die verschiedene Abhängigkeitsgrade von Morphin entwickelt hatten, ist in den folgenden Abbildungen gezeigt. Die einzelnen Kurven sind, mit der 3/4er-Gruppe beginnend, nach ihrem ansteigenden Abhängigkeitsgrad geordnet. Die durch Probenecid verursachte Anhäufung der HVA-Konzentration (Abb. 11) war bei den morphinabhängigen Tieren aller Abhängigkeitsgrade höher als in den Kontrollen; in der Gruppe 3/4 war die HVA-Konzentration auch ohne Probenecid-Einfluß signifikant erhöht. Abbildung 12 zeigt die entsprechenden Ergebnisse für 5-HIAA. Nach Probenecid waren die 5-HIAA-Werte bei den Tieren niedriger und mittlerer Morphinabhängigkeit (Gruppen 3/4, 6/10, 27/31) gegenüber den Placebo-implantierten Kontrollen signifikant angestiegen. Interessanterweise konnte in der Gruppe mit der höchsten Abhängigkeit (21/9) keine erhöhte Akkumulation gesehen werden. In dieser Gruppe konnte auch keine analgetische Wirkung selbst mit extrem hohen Dosen von über 1000 mg/kg Morphin mehr erreicht werden. Die Grundkonzentration der 5-HIAA war in den Gruppen 3/4 und 21/9 erhöht.

Wurde die Abhängigkeit von Morphin mit dem im experimentellen Teil, Kap. 2, beschriebenen Injektionsschema entwickelt, so war auch hier bei den Morphintieren eine höhere Akkumulation der HVA und 5-HIAA als in den Kontrolltieren festzustellen (Abb. 13). Dieser Effekt war bei der 5-HIAA allerdings weniger ausgeprägt. Eine ver-

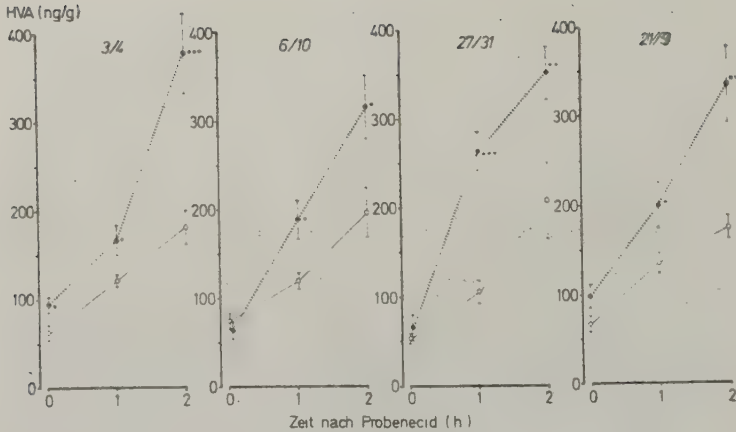


Abb.11: Akkumulationsrate der HVA nach Probenecid im Gehirn von Ratten mit verschiedenen Abhängigkeitsgraden (siehe Abb. 1). Die Tiere wurden mit Morphin- oder Placebopellets entsprechend des im exp. Teils, Kap. 2, beschriebenen Musters implantiert. Am letzten Tag der Implantationsperiode wurde Probenecid, 200 mg/kg, i.p. injiziert. Die Ordinate gibt die Konzentration der HVA in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Stunden nach Probenecid. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ s von 6 - 12 Ratten. ●---● Morphinpellets, ○—○ Placebopellets.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ von den Placebos (Student's t-Test oder Welch-Verfahren)

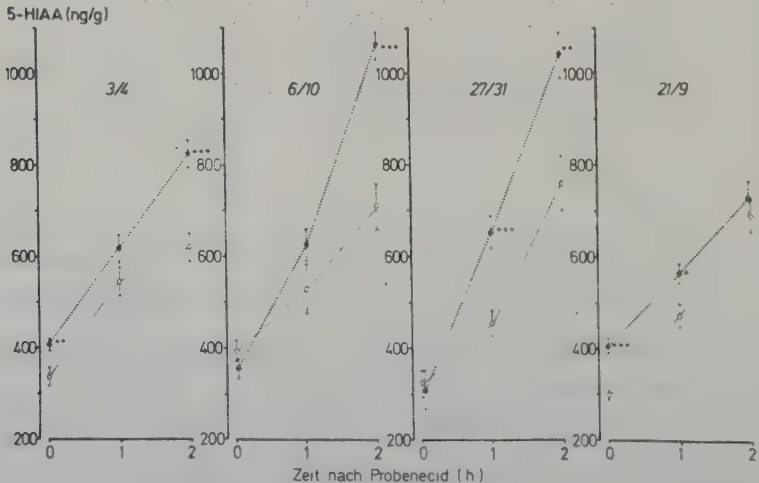


Abb.12: Akkumulationsrate der 5-HIAA. Weitere Erklärungen s. Abb.11

gleichbare Gruppe von Ratten, die nicht für die biochemischen Untersuchungen verwendet und nach dem gleichen Plan mit Morphin injiziert wurde, hatte gegenüber der antinozizeptiven Wirkung vollkommene Toleranz entwickelt. Dies wurde mittels der in Kap. 1.2. beschriebenen, elektrischen Schwanz-Reiz-Methode getestet.

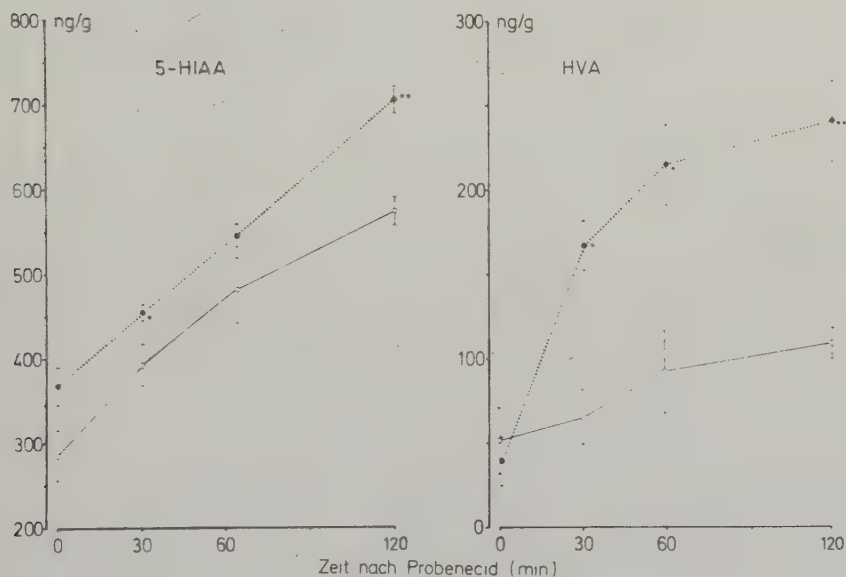


Abb. 13

Akkumulationsrate der HVA und 5-HIAA nach Probencid im Gehirn von Ratten, die nach wiederholten Injektionen der gleichen Morphindosis über einen Zeitraum von 3 Tagen eine vollkommene Toleranz entwickelt hatten (Injektionschema siehe exp. Teil, Kap. 2). Probencid, 200 mg/kg i.p., wurde am 9. Tag 30 Min. nach der letzten Injektion verabreicht. Die Ordinate gibt die Konzentration der HVA oder der 5-HIAA in ng/g an, die Abszisse die Zeit in Minuten nach Probencid. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert $\pm$ s von mindestens 6 Ratten.

●---● Morphin
 ——— Verbsalskontrollen

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ von den Kontrollen. Student's t-Test
 (ex post facto Verfahren)

Im Gegensatz zu HVA und 5-HIAA unterschied sich die Akkumulationsrate des MHPG-SO₄ weder in der 6/10-Gruppe noch in der am stärksten abhängigen 21/9-Gruppe signifikant von den mit Placebo implantierten Tieren (Tab. 6).

Tabelle 6: Akkumulationsrate des MHPG-SO₄ nach Probenecid im Gehirn von Ratten mit einem mittleren (Gruppe 6/10) und hohen (Gruppe 21/9) Abhängigkeitsgrad. Die Tiere beider Gruppen wurden nach dem im experimentellen Teil, Kap. 2 beschriebenen Schema mit Morphin- oder Placebo-pellets s.c. implantiert. Probenecid, 200 mg/kg i.p. wurde am letzten Tag der Implantationsperiode injiziert.

M H P G - S O₄ ng/g⁽¹⁾

Gruppe 6/10

Zeit nach Probenecid in Stunden	N	Placebo	x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾
0	6	316 ± 32	100	276 ± 32	100	87
1	6	480 ± 46	152	507 ± 47	184	106
2	6	655 ± 43	208	620 ± 37	225	94

Gruppe 21/9

Zeit nach Probenecid in Stunden	N	Placebo	x/o ⁽²⁾	Morphin	x/o ⁽²⁾	M/K ⁽³⁾
0	6	247 ± 25	100	267 ± 23	100	108
1	6	331 ± 22	134	370 ± 16	138	112
2	6	486 ± 31	196	512 ± 23	192	106

(1) Mittelwert ± s

(2) (Konzentration zur Zeit x / Konzentration zur Zeit o) x 100

(3) (Konzentration der Morphingruppe / Konzentration der Placebokontrollgruppe) x 100

5. DISKUSSION

5.1. AKUTE MORPHINWIRKUNGEN

Die akute Morphingabe scheint die Grundkonzentrationen des DA und NA im Gehirn nur für eine kurze Zeit zu erhöhen. Der DA-Spiegel, der infolge von 20 mg/kg dieses Alkaloids nach 15 Minuten leicht (Abb. 6) und nach 30 Minuten signifikant (Abb. 4) angestiegen war, war nach 1 Stunde bereits wieder auf den Normalwert abgesunken (Abb. 5). Der NA-Spiegel war nur 15 Minuten nach der gleichen Dosierung erhöht (Abb. 6) und nach 30 Minuten bereits nicht mehr verändert (Abb. 4).

Für die Diskussion der Befunde über die Wirkung des Morphins auf den DA-Umsatz sollen folgende grundlegenden Daten noch einmal genannt werden: 1) DA wird im Zytoplasma und nicht direkt in den synaptischen Vesikeln synthetisiert; nach der Synthese wird es allerdings sehr schnell zur Speicherung in die Vesikel aufgenommen (Moore and Dominic, 1971; Weiner et al., 1972); 2) die Halbwertszeit von neusynthetisiertem DA ist in den einzelnen Gehirnregionen sehr kurz (9 Minuten im Nucleus caudatus, Javoy and Glowinski, 1971); 3) AMT senkt die KA-Synthese innerhalb einer halben Stunde bis zu 90 % (Svensson and Waldeck, 1971; Besson et al., 1971). Demnach ist zu erwarten, daß neusynthetisiertes DA 1 Stunde (oder länger) nach AMT ausschließlich in den synaptischen Vesikeln zu finden ist, während das Amin vor der AMT-Gabe teils im Zytoplasma, teils in den

Vesikeln, vorliegt. Aus dem Vergleich der Morphinwirkungen vor und nach der AMT-Injektion kann man nun schließen, in welchem Zellbestandteil DA von Morphin beeinflusst wird. Wird das Alkaloid vor AMT injiziert, kann es sowohl auf das neu synthetisierte DA im Zytoplasma als auch auf das in den Vesikeln gespeicherte Amin wirken. Folglich kann es unter der erstgenannten Bedingung chemische Prozesse in Gang setzen, die unter letzterer nicht mehr möglich sind.

In den beschriebenen Experimenten steigerte Morphin, wenn es vor AMT verabreicht wurde, signifikant die Entleerung des DA. Wurde es eine Stunde oder länger nach AMT gegeben, war die Differenz jedoch nicht mehr signifikant. Diese Befunde sprechen also für einen Wirkungs-ort des Morphins innerhalb der Nervenzelle, und zwar im Zytoplasma und nicht in den synaptischen Vesikeln: hier mag es sowohl die Synthese des DA steigern als auch neu-synthetisiertes DA vor dessen Aufnahme in die Vesikel verstärkt den abbauenden Enzymen aussetzen. Wenn die Steigerung der Synthese dem vermehrten Abbau von neu-synthetisiertem DA zeitlich vorausgeht, könnte man auch die vorübergehende Erhöhung der DA-Spiegel bei der anfänglichen Bestimmung der Grundkonzentrationen erklären. Dies ist anzunehmen, da nach Tarver und Spector (1970) und Tryding et al. (1971) ein vermehrtes DA-Angebot die Aktivität der MAO stimuliert. Ähnliche Schlüsse wurden auch aus den Ergebnissen ganz anderer Versuche gezogen (Kuschinsky and Hornykiewicz, 1972;

Celsen and Kuschinsky, 1974).

Die erhöhte HVA-Akkumulation nach Morphin steht in vollem Einklang mit obiger Hypothese, da mit der Probenecid-Methode die gesamte Menge der HVA gemessen wird. Diese kann sowohl innerhalb als auch außerhalb des Neurons gebildet worden sein und von neusynthetisiertem oder gespeichertem Dopamin stammen.

Auch die folgenden, kürzlich veröffentlichten Befunde sprechen für die obengenannte neurochemische Wirkungsweise des Morphins: Clarke und Sampath (1973) stellten fest, daß die neusynthetisierten Amine bevorzugt von dem Enzym MAO inaktiviert werden. Nach Broch und Fonnum (1972) und Broch (1973) ist die KOMT ein zytoplasmatisches Enzym und nicht spezifisch für das postsynaptische Neuron. Es kann also infolge der vermehrten Bildung der HVA und der damit verbundenen, verstärkten Aktivität der Enzyme keine gesteigerte extraneuronale Freisetzung des DA und somit keine erhöhte katecholaminerge Aktivität erwartet werden.

Die Befunde dieser Arbeit scheinen zwei anderen möglichen Wirkungsmechanismen des Morphins auf den Metabolismus des DA zu widersprechen: 1) einer direkten Freisetzung aus den Speichergranula, wie es bei Reserpin der Fall ist; 2) einer Phenothiazin-ähnlichen Blockade der DA-Rezeptoren (Fuxe and Ungerstedt, 1970; Puri et al., 1973). Würde Morphin wirklich nach einem der beiden Mechanismen wirken, so müßte aus dem ersten eine vermehrte KA-Konzentration resultieren, unabhängig davon, ob das Alkaloid

vor oder nach AMT gegeben wurde. Ebenso dürfte der Zeitpunkt der Morphin-Injektion in bezug auf AMT die erhöhte KA-Entleerung nicht beeinflussen, welche ein Ergebnis dieses zweiten Mechanismus sein müßte.

Wenn die Folgerung korrekt ist, daß Morphin Dopamin nach dessen Aufnahme in die synaptischen Vesikel nicht beeinflußt und wenn es stimmt, daß das in den Vesikeln enthaltene Amin (Andén et al., 1969) und nur dieses Amin (Häggendahl and Malmfors, 1969; Almgren and Lundborg, 1971) mit der Nervenfunktion verbunden ist, dann wird die funktionelle Aktivität der dopaminergen Neurone durch Morphin nicht verändert. Deshalb können pharmakologisch experimentelle Daten, aus denen auf eine erhöhte dopaminerge Aktivität nach Morphin geschlossen wurde (Sugure, 1972), durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht gestützt werden. Wenn allerdings auch neu synthetisiertes DA eine funktionell aktive Rolle hat, unabhängig von vesikulärem DA, dann könnte aus dem erhöhten Katabolismus des ersteren ein funktionelles Defizit des Amins auf der Rezeptorseite entstehen. Ein solches dopaminerges Defizit könnte eine neurochemische Erklärung für die kataleptogene (Kuschinsky and Hornykiewicz, 1972) und analgetische (Fugui and Takagi, 1972; Costa et al., 1973) Wirkung des Morphins sein. Die Analgesie ist dann jedoch in geringerem Maße an diesem Mechanismus beteiligt, da gerade die stärksten und spezifischsten dopaminergen Antagonisten aus der Phenothiazin- und Butyrophenon-

reihe (Andén et al., 1970) keine starke analgetische Wirkung besitzen (Janssen, 1965).

Natürlich müssen auch die unterschiedlichen Tierspezies berücksichtigt werden, wenn aus biochemischen Daten Folgerungen auf pharmakologische Wirkungen diskutiert werden. So ruft Morphin bei Mäusen eine Amphetamin-ähnliche Wirkung hervor, indem es DA aus den präsynaptischen Speichern freisetzt, was nach Ahyán und Randrup (1973) und Kuschinsky und Hornykiewicz (1974) für die in dieser Spezies nach Morphin beobachtete motorische Erregung verantwortlich ist. Im Unterschied zu Mäusen tritt bei Ratten nach Morphin eine verminderte Lokomotion und eine motorische Starre bei erhöhtem Tonus (Katalepsie) auf. Die analgetische Wirkung des Morphins ist bei beiden Tierspezies vorhanden.

Der NA-Verbrauch im ZNS wurde von akut verabreichtem Morphin weder vor und nach AMT (Abb. 4 und 5), noch nach Dopacetamid (Abb. 6) beeinflusst. Ebenso wenig konnte eine gesteigerte MHPG-SO₄-Produktion (Tab. 4) festgestellt werden. Diese Beobachtung stimmt mit der von Sugure (1972) und Gunne et al. (1969) überein; Veränderungen in einzelnen Gehirnregionen sind ebenso wie bei DA jedoch nicht ausgeschlossen.

Die NA-Synthese findet in den synaptischen Vesikeln statt (Moore and Dominic, 1971). Deshalb steht der Befund, daß der NA-Metabolismus von Morphin nicht verändert wird, mit der Hypothese in Einklang, daß der Wirkungsort des Morphins für den Metabolismus der KA

im Zytoplasma und nicht in den synaptischen Vesikeln liegt.

Die 5-HT-Entleerungsrate war nach der Synthesehemmung mit Dopacetamid nicht verändert (Abb. 6), während die Akkumulation der 5-HIAA nach Hemmung des aktiven Transports mit Probenecid erhöht war (Abb. 8). Man kann diese beiden Befunde jedoch nicht direkt vergleichen, da die Morphindosis wegen der in Verbindung mit Dopacetamid beobachteten Toxizität nicht über 20 mg/kg erhöht werden konnte und die Wirkung nach Probenecid erst nach einer Dosis von 40 mg/kg Morphin signifikant war. Es ist trotzdem anzunehmen, daß Morphin in ähnlicher Weise auf den Umsatz des Serotonins wie auf den des Dopamins wirkt. In Abbildung 14 sind diese möglichen neurochemischen Wirkungen des Morphins am Beispiel des DA dargestellt:

- 1) Ein vermehrter intraneuronaler Abbau der neu synthetisierten Amine, welcher eventuell von einer Hemmung der Aufnahme in die synaptischen Vesikel begleitet ist. Dieser vermehrte intraneuronale Abbau kann dann durch eine Steigerung der Monoaminsynthese ausgeglichen werden, oder
- 2) eine direkte Stimulierung der Monoaminsynthese und ein daraus resultierender erhöhter intraneuronaler Katabolismus, welcher durch einen vermehrten Zugang zur MAO in die Mitochondrien oder durch eine direkte Stimulierung der MAO bewirkt sein kann.

WIRKUNGSMODELL DES MORPHINS AUF DEN METABOLISMUS DES DOPAMINS

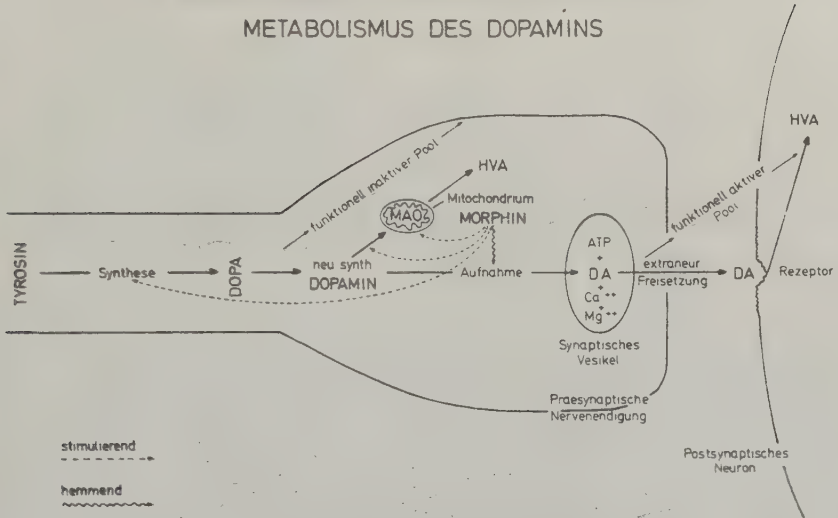


Abb. 14

Die Abbildung zeigt eine dopaminerge Nervenendigung mit einem synaptischen Vesikel und der entsprechenden Synapse. Der funktionell aktive Umsatz des Dopamins geht während der Nervenfunktionen von der Synthese zu der Aufnahme in das Vesikel und von dort zu der extraneuronalen Freisetzung an den postsynaptischen Rezeptor. Morphin leitet das neu synthetisierte Dopamin von der Aufnahme in das Vesikel zu einem intraneuronalen Abbau in einen funktionell inaktiven Weg um.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
DA	Dopamin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
HVA	Homovanillinsäure
MAO	Monoaminoxidase

Dies spiegelt sich in dem Anstieg der desaminierten, funktionell inaktiven Metabolite und in der unveränderten Freisetzung des funktionell aktiven Aminpools wider. Ob nun die Steigerung der Synthese eine Folge des erhöhten intraneuronalen Abbaus ist oder umgekehrt, in jedem Falle scheint Morphin störend in den Zellstoffwechsel einzugreifen, indem es den Umsatz der Transmitter in einer funktionell inaktiven Weise erhöht. Eine Folge eines solchen funktionell inaktiv erhöhten Umsatzes könnte ein Verlust der für den normalen Ablauf der Zellfunktion notwendigen Energie in den Mitochondrien sein. Ein Energieverlust in den Mitochondrien könnte mit ein Grund für die im gesamten Organismus nach Morphin auftretenden, verlangsamten Stoffwechselvorgänge sein.

5.2. CHRONISCHE MORPHINWIRKUNGEN

Auch in chronischer Verabreichung übt Morphin weiterhin einen störenden Einfluß auf den intraneuronalen Metabolismus des DA und 5-HT aus, d. h. es erhöht ebenso wie nach akuter Gabe die Bildung desaminierten Metabolite. Dies zeigten die Versuche mit Probenecid, in denen ein deutlicher Anstieg der Akkumulationsrate von HVA (Abb. 11) und von 5-HIAA (Abb. 12) nach der Blockierung ihres aktiven Transports aus dem ZNS zu sehen war. Wurde der Umsatz mit den Synthesehemmungs-Methoden bestimmt, war weder in den Versuchen

mit AMT (Abb. 9 und 10) noch in denen mit Dopacetamid (Tabelle 5) eine Veränderung in der Entleerungsrate des DA und 5-HT zu beobachten. Wie bereits erwähnt (Kap. 3.1.2. und 5.1.) ist diese Rate der funktionellen Aktivität der entsprechenden Neurone proportional. Daraus ist zu schließen, daß die dopaminergen und serotonergen Neurone auch bei morphinabhängigen Ratten normal arbeiten, d. h. die extraneuronale (funktionell aktive) Freisetzung des DA und 5-HT nicht verändert ist.

Ein gesteigerter Abbau ohne gleichzeitig erhöhte Entleerung vesikulärer Monoamine muß, wie bei der akuten Morphinwirkung, mit einer erhöhten Inaktivierung neu-synthetisierter Amine erklärt werden. Der Wirkungsort des Morphins liegt also auch nach chronischer Applikation im Zytoplasma, wo die Synthese stattfindet (siehe Kap. 5.1.). Da die Grundkonzentrationen des DA und 5-HT in den morphinabhängigen Ratten nicht verändert sind, dürfte eine erhöhte Monoaminsynthese den intraneuronalen Abbau kompensieren.

Eine alternative Erklärung für die vermehrte HVA- und 5-HIAA-Bildung ohne eine Veränderung in der Grundkonzentration von DA und 5-HT könnte eine Verschiebung im Metabolismus dieser Amine von dem Alkohol- in den Säureweg sein; doch ist die Beteiligung der alkoholischen Abbauprodukte des DA und 5-HT im normalen Ablauf des Gehirnmetabolismus so geringfügig (Johnsson and Lewander, 1969; Wilk and Zimmerberg, 1973; siehe auch

Kap.1.4.1. und 1.4.4.)), daß es selbst bei einer totalen Blockierung dieser Wege unwahrscheinlich ist, einen signifikanten Anstieg der HVA- und 5-HIAA-Bildung zu erhalten.

Die Akkumulation der HVA und 5-HIAA war bei allen mit Morphin behandelten Gruppen ungefähr gleich hoch, obwohl diese sich in ihrem Abhängigkeitsgrad sehr unterschieden (Abb. 1). Diese Beobachtung könnte vielleicht durch eine innerhalb der Probenecid-Technik liegende Begrenzung erklärt werden, vor allem, wenn man bedenkt, daß 2 Stunden nach der Hemmung des aktiven Transports ein Maximum in der Akkumulation der Metabolite erreicht sein kann. Ein passiver Übertritt der HVA und 5-HIAA aus dem ZNS und somit gleichbleibende Werte wären die Folge davon. Dies ist aber unwahrscheinlich, da selbst 1 Stunde nach Probenecid keine Beziehung zwischen den erhöhten Werten der akkumulierten Metabolite und dem Grad der Abhängigkeit besteht. So sprechen diese Befunde gegen die Folgerungen von Way (1972) und Smith (1972), nach denen Änderungen im 5-HT- oder DA-Turnover mit den Mechanismen der Toleranz und Abhängigkeit verknüpft sein sollen. Die ungefähr gleich hohe HVA- und 5-HIAA-Bildung und die unveränderte Entleerung der Amine nach AMT in den Gruppen sehr verschiedener Abhängigkeitsgrade besagt vielmehr, daß ein bestimmter Grad von pharmakologischer Toleranz für diesen metabolischen Effekt erreicht wurde. Im Falle der 5-HIAA scheint in der am stärksten abhängigen

Gruppe (21/9) eine fast absolute Toleranz für die vermehrte Bildung erreicht zu sein. Eine absolute Toleranz für diese biochemische Wirkung des Morphins ist nicht leicht zu erzeugen. Die Dosis von Morphin, die nach wiederholter Gabe über 8 Tage vollkommen für die antinozizeptive Wirkung toleriert wurde (Abb. 13), verursachte immer noch einen ähnlich hohen Anstieg der HVA und 5-HIAA-Akkumulation wie ihre erste Injektion (Abb. 7 und 8).

Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen überein, die Clouet und Ratner (1970) bei Ratten erhielten, doch widersprechen sie der schnellen Toleranzentwicklung gegenüber dem erhöhten KA-Turnover, welche Smith et al. (1970; 1972) bei Mäusen beobachteten. Sowohl verschiedene Tierspezies als auch methodologische Unterschiede können jedoch die Ursache dieser Widersprüche sein.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit denen von Way (1972) und anderen Autoren (siehe 1.5.) überein, nach denen chronische Morphinverabreichung den Umsatz von 5-HT erhöht. Sie sprechen jedoch gegen die Hypothese, nach der diese biochemischen Veränderungen mit der Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit in einer kausalen Beziehung stehen sollen. Der Grund, warum in anderen Untersuchungen kein erhöhter 5-HT-Turnover nach chronischer Morphingabe gefunden werden konnte (siehe 1.5.), kann neben den unterschiedlichen Tierspezies

und den erreichten Abhängigkeitsgraden auch in der Verschiedenheit der Methoden liegen, nach denen die Syntheserate der Monoamine bestimmt wurde. Aus den vorliegenden Ergebnissen geht hervor, daß eine gute Bewertung der Syntheserate während chronischer Morphinverabreichung nur erreicht werden kann, wenn die gesamte oder zumindest die hauptsächliche Menge der gebildeten Metabolite unter gleichbleibenden Bedingungen nach Hemmung ihres aktiven Transports aus dem ZNS gemessen wird.

Die Methoden, die den Verbrauch der Monoamine nach der konventionellen Art der Synthesehemmung bestimmen, (3.1.2.) können einen unveränderten Turnover vortäuschen. Sie können weder zwischen extraneuronaler Freisetzung und intraneuronalem Katabolismus unterscheiden, noch den totalen Turnover (funktionell aktiver + funktionell inaktiver Pool) widerspiegeln. (Bei chronischer Morphingabe kann die modifizierte Synthesehemmungsmethode nicht angewendet werden.)

Die Methoden, welche die Umwandlungsrate radioaktiver Vorstufen der Amine in die KA oder 5-HT im ZNS messen, können die tatsächliche Turnoverrate der Monoamine unterbewerten. Sie messen nur die Menge der Amine, die im Augenblick vorhanden ist, ohne die Fraktionen in Betracht zu ziehen, die als Metabolite verlorengehen.

Autoren, welche die Pargylinmethode zur Bestimmung des 5-HT-Umsatzes bei morphinabhängigen Tieren benutzten, erhielten sehr widersprüchliche Ergebnisse. Pargylin

hat eine Wirkung auf den Morphinentzug (Maruyama et al., 1971) und erzeugt bereits nach einer Stunde eine motorische Erregung bei morphinabhängigen Ratten (Herz et al., 1974), das heißt gerade zu dem Zeitpunkt, zu dem die biochemischen Messungen durchgeführt werden sollten. Die durch AMT bewirkten motorischen Veränderungen bei toleranten Ratten treten jedoch nicht vor 4 - 5 Stunden auf (nicht veröffentlichte Daten). Die durch Pargylin ausgelösten Veränderungen im Verhalten der Tiere können bereits in sich selbst eine Wirkung auf den 5-HT Turnover haben und deshalb die Befunde aus dem Toleranzgeschehen überdecken.

In den meisten der morphinabhängigen Gruppen war der Umsatz des NA normal. Dieser Befund ist - ebenso wie der nach akuter Morphingabe - in Übereinstimmung mit Gunne et al. (1969); er basiert sowohl auf der unveränderten Entleerungsrate nach der Synthesehemmung mit AMT (Abb. 9 und 10) oder Dopacetamid (Tab. 5), als auch auf der unveränderten Akkumulationsrate von MHPG-SO_4 nach Probenecid (Tab. 6). In Tieren mit einem sehr hohen Abhängigkeitsgrad (Gruppe 21/9) war sogar eine Verzögerung der NA-Entleerung zu sehen. Also scheint auch dieses Amin nicht für die Morphintoleranz verantwortlich zu sein.

E X P E R I M E N T E L L E R

T E I L

1. MATERIALIEN

1.1. SUBSTANZEN

Morphinhydrochlorid (Merck, Darmstadt) wurde bei allen akuten Versuchen subkutan injiziert. DL-alpha-methyl-p-tyrosin-methylester HCl (AMT) (H44/68, Batch 150 Lakremi AB, Göteborg/Stockholm, Schweden), Alpha-propyl-dopacetamid (Dopacetamid) (p-Dihydroxy-alpha-propylphenyl-essigsäureamid, H22/54, Carl Roth, Karlsruhe) und Probenecid (p-Di-n-propylsulfamoylbenzoesäure, Sharp und Dohme GmbH, München) wurden bei allen Versuchen intraperitoneal gespritzt. Alle Dosierungen beziehen sich auf die freien Verbindungen als Basen, Aminosäuren oder Amine und nicht auf die verschiedenen Salze oder Ester.

Morphin HCl und AMT wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst; 3,75 g Dopacetamid wurde in 50 ml Propylenglycol gelöst und die Lösung dann mit 75 ml 3 %iger NaCl-Lösung verdünnt; 200 mg Probenecid wurden in 2 ml 1 N NaOH gelöst, dann wurden 2,6 ml 0,5 M Phosphatpuffer von pH 7,0 hinzugefügt und die Lösung dann mit 0,4 ml 1 N HCl neutralisiert. Bei allen Versuchen wurden folgende Standarddosens injiziert: 250 mg/kg AMT, 500 mg/kg Dopacetamid und 200 mg/kg Probenecid. Zeitintervalle sind in den Tabellen und Abbildungen zu ersehen.

Herstellung der Morphinpellets:

Ein Standardpellet wurde nach Gibson und Tingstad (1970) hergestellt aus:

75 mg Morphinbase

75 mg Mikrokristalline Cellulose (Avicel)

0,75 mg Gefällte Kieselsäure ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O} = \text{Aerosil}$)

1,5 mg Calciumstearat

Die Substanzen wurden gemischt und durch ein Sieb mit einer Maschenbreite von 0,63 mm gesiebt. Dieses Trockengranulat wurde in einer Korsch-Expandertablettiermaschine zu Tabletten von 152 mg Gewicht, 3 mm Dicke und einem Durchmesser von 9 mm gepreßt. Die Härte der Tabletten hielt in dem Stokes-Hardness-Tester einem Druck von 2 kg stand. Diese Standardisierung war notwendig, um eine gleichmäßige Adsorption des Morphins aus den Pellets in die Gewebeflüssigkeit zu gewährleisten.

Die Morphinbase wurde folgendermaßen hergestellt:

100,0 g Morphinhydrochlorid wurden unter Rühren in 1600 ml destilliertem Wasser unter Erwärmen gelöst und die warme Lösung durch Zugabe von 5 N NaOH (ca. 50 ml) auf pH 8 neutralisiert. Dann wurde die Suspension bis gerade zum Aufkochen gebracht und danach auf 30° abgekühlt. Die Morphinbase wurde abgenutscht, mit dem Filtrat nachgewaschen und bei 80° - 100° C im Trockenschrank getrocknet.

100,0 g Morphinhydrochlorid ergaben ca. 75 g Morphinbase.

Standardlösungen der Analysen:

HVA: 10,0 mg Homovanillinsäure (Roth, Karlsruhe) in 10,0 ml 0,01 N HCl. 100 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (1 ng/ μ l) = Stammlösung (SL).

5-HIAA: 10,0 mg 5-Hydroxy-3-Indolessigsäure (Roth, Karlsruhe) in 0,01 N HCl. 100 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (1 ng/ μ l) = SL.

DA: 12,35 mg 3-Hydroxytyramin-hydrochlorid (Serva, Heidelberg) + 100 μ l konz. Essigsäure in 10,0 ml H₂O. 500 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (5 ng/ μ l) = SL.

NA: 18,23 mg L-Noradrenalin-L-hydrogentartrat (Roth, Karlsruhe) + 100 μ l konz. Essigsäure in 10,0 ml H₂O. 300 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (3 ng/ μ l) = SL.

MHPG-SO₄: 10 mg 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthylenglykol-sulfat (Hoffmann La Roche, Basel) in 10,0 ml H₂O. 100 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (1 ng/ μ l) = SL.

5-HT: 23,1 mg Serotonin-kreatininsulfat-monohydrat (Roth, Karlsruhe) in 10,0 ml 0,01 N HCl. 100 μ l dieser Stocksolution in 100,0 ml H₂O (1 ng/ μ l) = SL.

Aluminiumoxyd:

Ca. 200 g Al_2O_3 (Woelm neutral) wurden mit 1 l 2 N HCl (730 ml H_2O + 270 ml 25%iger HCl) unter kräftigem Rühren 30 Minuten gekocht. Nach dem Absitzen wurde die Säure abgegossen und der Rückstand mit ca. 300 ml 2 N HCl aufgerührt. Der klare Rückstand wurde abgegossen und mit 400 ml-Portionen entionisierten Wassers ca. 20 mal bis zu einem pH von ca. 4 gewaschen. Jetzt wurde kräftig umgeschwenkt, die Hauptmenge absitzen lassen und die überstehende Flüssigkeit mitsamt feinen Teilchen abgegossen. Dann wurde das Aluminiumoxyd über Nacht an der Luft getrocknet und danach noch einmal 2 Stunden bei 200°C .

Amberlite-Gel:

Das Harz (Amberlite CG-50 Type I, Maschenweite 100 - 200) wurde mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen, um die feinen Teilchen zu entfernen. Dabei wurde es mit 2 Volumenteilen Wasser umgerührt und die überstehende Suspension nach dem Absitzen der festen Teilchen dekantiert. Dieser Vorgang wurde 10 - 15 mal wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit klar war. Danach wurde das Harz mit 5 Volumenteilen 3 N HCl über einem Filter ausgewaschen. Darauf folgend wurde die Säure mit Wasser bis zum neutralen pH ausgespült und das Harz mit 20 Volumenteilen eines 0,1 M Phosphatpuffers, der 0,1 % EDTA enthielt, auf pH 6,5 gepuffert. Dabei wurde es solange mit dem Puffer überspült, bis der pH des letzten Filtrates mit dem des aufgegossenen Puffers

identisch war. Das so gereinigte Harz konnte in der Pufferlösung bei 4° C mehrere Wochen gelagert werden.

Sephadex-Gel:

Das Polysaccharid (DEAE-Sephadex-A-25, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) mußte vor Gebrauch 24 Stunden im Überschuß von H₂O quellen. Danach wurden die feinen Anteile dekantiert. Jetzt wurde über einem Filter zuerst mit 0,5 N HCl, dann mit H₂O ausgewaschen (zu lange Behandlung mit starker Säure ist wegen der Gefahr eines Hydrolysisierens des Austauschers zu vermeiden).

Nach Behandeln mit 0,5 NaOH wurde wieder mit Wasser ausgewaschen. Schließlich wurde das Polysaccharid mit dem in der Analyse verwendeten Puffer bis zum Gleichgewicht ausgewaschen.

Bei allen Analysen wurden nur Chemikalien höchsten Reinheitsgrades verwendet, wenn möglich Suprapur-Qualität (Merck AG, Darmstadt). Zur Herstellung aller Lösungen und bei allen Waschverfahren wurde nur doppelt glasdestilliertes Wasser (Aqua bidest.) verwendet. Alle Glasgeräte wurden in halbkonzentrierter Salpetersäure gesäubert und danach in Aqua bidest. mehrmals gewaschen.

1.2. GERÄTE

Alle Gehirne wurden in einem Potter S Homogenisator (Braun, Melsungen) in Gefäßen aus Bromsilikatglas mit eingeschliffenen Glaskolben im Eisbad bei einer Drehzahl von 1000 Umdr./Min. homogenisiert. Zur Zentrifugation des Homogenisats wurde eine Sorvall-Superspeed-RC2-B-Zentrifuge (Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Conn., USA) mit einer Betriebstemperatur von 0° C benutzt. Beim Extraktions- bzw. Elutionsschritt der Butylazetat- bzw. Aluminiumoxydmethoden wurde in einer Mistral GL-Zentrifuge der Firma Measury & Scientific Equipment Ltd., London, England, zentrifugiert. Die Fluoreszenzmessungen wurden in einem Fluoreszenzspektrophotometer MPF-2A der Firma Perkin-Elmer, Hitachi, Japan, durchgeführt.

2. TIERVERSUCHE

In allen Experimenten wurden männliche, Sprague-Dawley-Ratten mit einem anfänglichen Körpergewicht von ca. 200 g benutzt. Die Tiere wurden bei den akuten Versuchen in Gruppen zu je drei, und bei den chronischen Versuchen in Gruppen zu je fünf, in einem Käfig gehalten. Wasser und Trockenfutter standen ad libidum zur Verfügung. Der Tag- und Nachtrhythmus wurde in dem Rattenraum konstant gehalten.

In den chronischen Experimenten wurden, wenn die Abhängigkeit mittels eines Morphindepots entwickelt wurde, eines oder mehrere Morphin- oder Placebopellets subkutan auf den Rücken und den Flanken der Tiere unter Ätheranästhesie implantiert. Für jede neue Implantation wurde eine noch intakte Hautfläche ausgewählt.

In der sogenannten 3/4-Gruppe wurde jeden Tag über einen Zeitraum von 3 Tagen 1 Pellet implantiert und die Turnover-Untersuchungen am vierten Tag 24 Stunden nach der letzten Implantation, ausgeführt. In der sogenannten 6/10-Gruppe wurde am ersten Tag 1 Pellet, am vierten Tag 2 Pellets und am siebten Tag 3 Pellets implantiert und die biochemischen Experimente am zehnten Tag vorgenommen. In der 27/31-Gruppe wurde das Implantationsschema der 6/10-Gruppe verlängert, indem jeden vierten Tag bis zu dem 28. Tag 3 Pellets implantiert und die biochemischen Experimente am 31. Tag durchgeführt wurden. In der 21/9-Gruppe wurde am ersten Tag 1 Pellet, am zweiten Tag 2 Pellets und vom dritten bis zum achten Tag täglich 3 Pellets implantiert und die biochemischen Experimente am neunten Tag gemacht.

Kontrollratten wurden in derselben Weise mit Placebopellets, welche nur die Trägersubstanzen enthielten, implantiert. Die Pellets wurden nicht entfernt. Nur in einem speziellen Fall wurden die Tiere durch wiederholte Injektionen von Morphinhydrochlorid abhängig gemacht. Das Morphin wurde alle acht Stunden über einen Zeitraum von 8 Tagen verabreicht. Die Anfangsdosis von 20 mg/kg wurde im Laufe von zwei Tagen auf

die Erhaltungsdosis von 40 mg/kg gesteigert. Die Kontrollratten wurden in der gleichen Häufigkeit wie die Morphingruppe mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

Die Entnahme der zur quantitativen Analyse bestimmten Gehirne erfolgte möglichst um die gleiche Tageszeit, zwischen 14 und 18 Uhr. Es war darauf zu achten, daß die Tiere nicht mit chemischen Mitteln (Chloroform, Äther o.ä.), sondern nur mit mechanischen Mitteln getötet wurden. Bei der Entnahme der Gehirne durfte der Corpus pineale auf keinen Fall mit zur Analyse gelangen, da er besonders viele Amine enthält und das Ergebnis verfälschen würde. Die Gehirne wurden in eiskalter, physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt, danach die feinen blutigen Häute abgezogen und eventuell anhaftende Felhhärchen entfernt. Nach dieser Säuberung wurden die Hirne sofort in Aluminiumfolie auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse tiefgefroren bei -30°C aufbewahrt.

3. METHODEN DER ANALYSEN

3.1. HOMO VANILLINSÄURE UND 5-HYDROXYINDOLESSIGSÄURE (EXTRAKTION)

12 - 18 Gehirne wurden einzeln gewogen und in je 8 ml $0,4\text{ N HClO}_4$ + 0,25 mg/ml Cystein homogenisiert. Zu

4 x 8 ml HClO_4 wurden die internen Standards, (IS = 200 ng HVA und 500 ng 5-HIAA) gegeben. Alle Proben wurden bei 20.000 RPM 20 Minuten in der Sorvallzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in 50 ml Extraktionsgläser mit Glasstopfen gegeben, 1 g NaCl hinzugefügt und mit 25 ml Butylacetat (Essigsäure-n-butylester) extrahiert, in dem alle Proben zehn Minuten mechanisch geschüttelt wurden. Diese Gläser wurden danach zehn Minuten bei 4000 RPM in der Mistralzentrifuge zentrifugiert. 20 ml der organischen Phase wurden in neue 50 ml Extraktionsgläser mit Glasstopfen pipettiert. Die organische Phase wurde mit 6,5 ml 0,05 M TRIS-Pufferlösung von pH 9,5 (6,0 g TRIS-hydroxymethyl-aminomethan in 1 l H_2O) mechanisch geschüttelt. Danach wurden die Gläser in der Mistralzentrifuge bei 2.000 RPM 5 Minuten lang gefahren. Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, abgesaugt. 1,5 ml der wässrigen Phase wurden für die fluorimetrischen Bestimmung der HVA Proben und 1,0 ml für die der 5-HIAA Proben in Reagenzgläser pipettiert. Ebenso wurden 1,5 ml der wässrigen Phase für die Blindwertbestimmungen (Blanks) der HVA-Reaktion und 1,0 ml für die der 5-HIAA Reaktion verwendet. Für die Bestimmung der externen Standards wurden zu 4 x 1,5 ml für HVA und 4 x 1,0 ml für 5-HIAA einer nicht extrahierten TRIS-Pufferlösung je 50 ng HVA bzw. 50 ng 5-HIAA gegeben (= 2 externe Standards + 2 Reagenzblanks).

Fluorometrische Bestimmung der HVA:

- 1) Die Proben wurden mit 0,2 ml einer 0,01 %igen $K_3 Fe(CN)_6$ Lösung in 10 N $(NH_4) OH$ Lösung, frisch zubereitet, oxydiert.
- 2) Nach vier Minuten wurden 0,1 ml einer 0,2 %igen Cysteinlösung in H_2O , ebenso frisch zubereitet, hinzugefügt.

Für die Blanks wurden die Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge einpipettiert. Nach 30 Minuten wurden alle Proben im Spektrophotometer mit einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 422 nm (W.L. 320/422) nach Vorschalten eines Blaufilters und Spaltbreiten von 14/14 gelesen. Die Photometerempfindlichkeit betrug 3 oder 4 (Slits 14/14; Sens 3/4).

Fluorometrische Bestimmung der 5-HIAA:

Aus 1 ml des TRIS-Extraktes wurde die Reaktion in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- 1) 0,1 ml 1 %ige Cysteinlösung in H_2O
- 2) 2 ml konz. HCl (32 %ig)
- 3) 0,1 ml Natriummetaperjodat ($NaJO_4$), 0,02 %ige Lösung in H_2O .
- 4) 0,1 ml Orthophtalaldehyd (OPT), 0,1 %ige Lösung in Methanol.

Für die Blanks wurde die Reihenfolge geändert in: 3), 2), dann 15 Minuten gewartet und dann 1) und 4). Alle Proben wurden dann 15 Minuten bei $100^{\circ} C$ im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Fluoreszenz der 5-HIAA in den Proben im Spektrophotometer bei W. L.

356/422, Slits 8/8 und Sens. 4/5 gelesen.

3.2. DOPAMIN UND NORADRENALIN (ADSORPTION MIT Al_2O_3)

12 Gehirne wurden einzeln gewogen und in je 8 ml 0,4N HClO_4 + 50 mg % EDTA (Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz) + 50 mg % Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), frisch zubereitet, homogenisiert. Das Homogenat wurde geteilt und nur eine Hälfte verwendet. Bei 4 Gehirnen wurden in die zweite Hälfte des Homogenats die internen Standards (IS = 500 ng DA und 300 ng NA) einpipetiert und die Proben 15 Minuten bei 20.000 RPN zentrifugiert. Der Überstand wurde in 25 ml Gläser mit konischem Boden und geschliffenen Glasstopfen gegeben und 4 ml 0,5 M Natriumacetatpuffer von pH 8,3, der 5 % EDTA enthielt, und dann etwa 10 mg NaHSO_3 oder $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ hinzugefügt. Mit 5N und 1N NaOH wurden alle Proben auf pH 8,3 titriert. Zu jeder Probe wurden 400 mg Aluminiumoxid gegeben und 15 Minuten bei schwacher Rotierung mechanisch geschüttelt. Das Aluminiumoxid wurde zweimal mit 10 ml H_2O gewaschen. Mit 5 ml 0,05N HClO_4 wurde eluiert, indem die Probengläser 15 Minuten bei mittlerer Stärke geschüttelt und danach 5 Minuten bei 2000 RPM in der Mistralzentrifuge gefahren wurden. 2 x 1 ml des Eluates wurden mit 0,5 ml 0,25 M Phosphatpuffer von pH 6,8 in je 2 Testgläser mit Glasschliffstopfen gemischt. Davon diente jeweils eine Mischung als Blindprobe (Blank). Viermal 1 ml 0,05N HClO_4 wurden

mit 0,5 ml 0,25 M Phosphatpuffer vermischt und 50 ng DA und 50 ng NA hinzugefügt (= 2 Reaktionsblanks + externe Standards).

Fluorometrische Bestimmung von DA und NA:

Die Blanks wurden in der Reihenfolge

- 1) 0,150 ml Eisessig (CH_3COOH 96 %ig)
- 2) 0,5 ml alkalische Sulfitlösung (2,5 NaOH + 1 % EDTA + 2,5 % Na_2SO_3)
- 3) 0,1 ml Jodlösung (250 mg Jod + 5 g KJ wurden in etwas H_2O gelöst, auf 100,0 ml mit H_2O aufgefüllt) mit den Reagenzien versetzt. Der pH wurde durch Veränderung des Eisessigvolumens auf $4,9 \pm 0,1$ eingestellt. Mit den Proben und den beiden externen Standards wurde die Reaktion in folgender Weise durchgeführt:
 - 1) 0,1 ml Jodlösung wurde im Zeitabstand von 10 Sekunden in die Proben pipettiert.
 - 2) Nach 3 Minuten folgten 0,5 ml alkalische Sulfitlösung, und
 - 3) nach weiteren 5 Minuten 0,15 ml Eisessig.

Alle Gläser blieben 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Das Lesen der Proben erfolgte im Spektrophotometer für NA bei W. L. 396/470, Slits 9/9 und Sens. 5.

Nach dem Lesen des NA wurden 0,1 ml Eisessig in jede Probe pipettiert. Der pH mußte jetzt $4,4 \pm 0,1$ sein. Alle Proben wurden für 40 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Fluoreszenz des DA bei W. L. 320/360, Slits 7/7 und Sens. 5 bestimmt.

3.3. DOPAMIN, NORADRENALIN UND SEROTONIN (KATIONENAUSTAUSCH)

Am Tag vor der Analyse wurden die Austauschersäulen gewaschen mit:

15 ml 2 N HCl

15 ml 2 N HCl/Äthanol 96%ig 1:1

Am Tag der Analyse wurde das Waschen der Säulen fortgesetzt mit:

15 ml 2 N NaOH + 0,1 % EDTA

15 ml H₂O + 0,1 % EDTA

10 ml H₂O + 0,1 % EDTA

15 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,5 + 0,1 % EDTA

Als Säulen wurden 15 cm lange Pasteurpipetten mit einem Durchmesser von 6 mm verwendet, an deren oberes Ende ein etwa 5 cm langer, oben 5 cm breiter Trichter geschmolzen wurde. Die Säulen wurden mit etwas Glaswolle verschlossen und 5 cm hoch mit Amberlite CG-50 Harz für jeweils 4 - 5 Bestimmungen bepackt.

18 Gehirne wurden einzeln gewogen und mit je 8 ml HClO₄ + 1 % EDTA + 4 mg Na₂S₂O₅ homogenisiert. Das Homogenisat wurde in zwei Hälften geteilt und nur eine Hälfte zur Bestimmung verwendet. Von vier Hirnen wurde auch die zweite Hälfte zur Mitführung der internen Standards in Zentrifugengläser gegeben (IS = 1000 ng DA, 1000 ng NA und 500 ng 5-HT).

Die Homogenisate wurden bei 20.000 RPM 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Polypropylenzentrifugenröhrchen gegeben und 2,0 ml 0,5 M Phosphatpuffer

pH 6,0 + 1 % EDTA und 10 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ hinzugefügt. Die so gepufferten Überstände wurden mit 2 N und 0,1 N KOH auf pH 6,0 $\pm$ 0,1 titriert, wobei die Röhrchen stets in Eiswasser gekühlt waren. Danach wurde wieder in der Sorvall bei 14.000 RPM für fünf Minuten zur Ausfällung des KClO_4 zentrifugiert. Die Überstände wurden auf die Säulen gegeben und auf folgende Art behandelt:

10 ml H_2O + 0,1 % EDTA

15 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,5 + 0,1 % EDTA

10 ml H_2O + 0,1 % EDTA.

Danach wurden die Amine mit 6 ml 2 N HCl/Äthanol 96 %ig 1:1 eluiert. Mit zweimal 1 ml dieses Eluats wurde die fluorometrische Bestimmung des 5-HT mit der OPT-Methode, wie in K.3.1. für 5-HIAA beschrieben, durchgeführt. Die verbleibenden 4 ml des Eluats wurden nach Zugabe von 2 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,8 + 0,1 % EDTA mit 10 N und 1 N NaOH auf pH 6,8 titriert. Das Endvolumen jeder Probe wurde gemessen und die Werte für die Wiederfindungsberechnung gemittelt. Mit 2 x 1,5 ml dieser Lösung wurde die fluorometrische Bestimmung von DA und NA, wie in K.3.2. beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde die Menge des Eisessigs, die notwendig war, um die Proben bei der NA-Bestimmung auf pH 4,9 $\pm$ 0,1 und bei der DA-Bestimmung auf pH 4,4 $\pm$ 0,1 einzustellen, jedesmal neu überprüft. Das Volumen des Eisessigs betrug für NA 150 $\pm$ 25 und für DA 100 $\pm$ 25 μ l. Von dem Eluat der "Blindsäulen" wurden entsprechende Volumina für die Bestimmung der externen Standards (DA und NA = 100 ng, 5-HT = 50 ng) entnommen.

3.4. 3-METHOXY-4-HYDROXYPHENYLGLYKOLSULFAT

(ANIONENAUSTAUSCH)

18 Gehirne wurden einzeln gewogen und in je 8 ml 0,2 M ZnSO_4 -Lösung (57,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in einem Liter H_2O) homogenisiert. Das Homogenisat wurde halbiert, wobei zu jeweils 4 Hälften die internen Standards (300 ng MHPG-SO_4) hinzugefügt wurden. Die abpipettierten Hälften der anderen Proben wurden verworfen. Jedem Zentrifugenglas wurden 4 ml 0,2 M Ba(OH)_2 (63,0 g $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l H_2O) zugefügt und dann bei 17.000 RPM 17 Minuten in der Sorvallzentrifuge gefahren. Zwei Blindproben für die externen Standards, die je 4 ml 0,2 M ZnSO_4 -Lösung und 0,2 M Ba(OH)_2 Lösung enthielten, wurden mitgeführt. Der Überstand wurde auf Säulen gleicher Bauart wie in 3.3. beschrieben, gegeben, die 4 cm hoch mit DEAE Sephadex A-25 bepackt waren. Die Säulen waren zuvor in folgender Reihenfolge gewaschen worden: 10 ml H_2O , dann 10 ml 0,1 N NaOH , dann wieder 10,0 ml H_2O . Jetzt wurden die Säulen mit 7,5 ml 0,01 N HCl ausgewaschen und mit 5,5 ml 0,15 N HCl des MHPG-SO_4 eluiert. Dem Eluat wurden 0,2 ml einer frisch mit H_2O zubereiteten 1,5 %igen Cysteiniumchloridmonohydratlösung und 0,3 ml 60 %ige HClO_4 zupipettiert. Das Gesamtvolumen betrug jetzt 6,0 ml. Die Blindproben wurden ebenso behandelt.

Fluorometrische Bestimmung des MHPG-sulfats :

Je 2 ml für die Experimentproben (Samples) und die Blindproben (Blanks) wurden aus jedem Fläschchen in

die Testgläser gegeben und die externen Standards (500 ng MHPG-SO₄) wurden in die Proben der 4 Testgläser aus den Blindsäulen (= 2 externe Standards + 2 Blanks) pipettiert. Alle Samples (nicht die Blanks) wurden dann 12 Minuten bei 100° C im Wasserbad gekocht und danach zu allen Proben (Samples eingeschlossen Blanks) 0,3 ml zweimal destilliertes Äthylendiamin gegeben. Alle Proben wurden jetzt noch einmal bei 100° C im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Fluoreszenz der Proben bei W. L. 328/450 nm, Slits 10/10 und Sens. 4 gelesen.

4. AUSWERTUNG UND STATISTISCHE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Auswertung der Ergebnisse einer quantitativen Analyse ist im folgenden am Beispiel einer Extraktionsanalyse zur Bestimmung der HVA in ng pro g Gehirn dargestellt.

Fluoreszenzeinheiten						
Lfd. Nr.	Gruppen Nr.	Gehirn- gew. g	Sample (Probe)	Blank (Blind- probe)	S-B	ng/g
1	1	1,833	57	36	21	93,5
2	1	1,997	55	34	21	86
3	1	1,822	53	35	18	81
4	2	1,907	67	31	36	154
5	2	1,825	66	29	37	165,5
6	2	1,714	62	27,5	34,5	164,5
usw.						
IS 1	interner Standard = 200 ng HVA		64	39	25	
IS 2			63	38	25	
IS 3			62	38	24	24,5
IS 4			64	40	24	
ES 1	externer Standard = 50 ng HVA		68	30	38	
ES 2			69	31	38	38

$$\text{ng/g} = \frac{(S - B) \times \text{IS ng}}{\text{IS} \times \text{Gehirngewicht}} = \frac{21 \times 200}{24,5 \times 1,833} = 93,5$$

(Gehirn Nr. 1)

$$\text{Recovery} = \frac{\text{IS}}{\text{ES}} \times \frac{\text{KF} \times 100}{\frac{\text{IS ng}}{\text{ES ng}}} = \frac{24,5}{38} \times \frac{5,4166}{\frac{200}{50}} = 87,3 \%$$

$$\text{KF} = \frac{\text{letztes Volumen IS}}{\text{letztes Volumen ES}} = \frac{25}{20} \times \frac{6,5}{1,5} = 5,4166$$

(KF = Korrekturfaktor)

Die statistische Auswertung der Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Mittelwerten der Gruppen erfolgte mittels des "two tailed Student's t-test"; bei ungleichen Varianzen wurde das Welch-Verfahren angewandt (Ferguson, 1966).

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Wirkungen akuter und chronischer Morphingabe auf den Stoffwechsel des Serotonins (5-HT), Dopamins (DA) und Noradrenalins (NA) im Zentralnervensystem (ZNS) von Ratten wurden mittels eines Vergleiches verschiedener Umsatzbestimmungs- und Analysenmethoden untersucht.

Zur Korrelation mit den Veränderungen im Stoffwechsel der biogenen Amine (BA) wurde Morphin akut in verschiedenen hohen Dosierungen injiziert und chronisch zur Erzeugung unterschiedlicher Grade von Abhängigkeit und Toleranz durch Variation eines Musters wiederholt injiziert oder in Form von Depottabletten unter die Haut der Tiere implantiert. Da sich Abhängigkeit und Toleranz parallel entwickeln (Theiss et al., 1974), wurde nur der jeweilige Grad der Toleranz bestimmt, indem der Anstieg der Effektivdosis von Morphin für einen antinozizeptiven Effekt (Vokalisationstest) gemessen wurde.

Der Umsatz der BA wurde durch die Hemmung ihrer Synthese mit Alpha-propyldopacetamid (Dopacetamid) oder Alpha-methyltyrosin (AMT) und durch die Blockade des aktiven Transports ihrer Säuremetabolite aus dem ZNS und Liquor in die Blutbahn mit Probenecid bestimmt. Die Synthesehemmungsmethode nach Costa und Neff (1966) wurde verbessert. Somit konnte zwischen funktionell aktivem, d. h. extraneuronaler Freisetzung der Amine aus den Vesikeln, und funktionell inaktivem Turnover, d. h. erhöhtem intraneuronalem Abbau, unterschieden werden.

Zur quantitativen Bestimmung der BA und ihrer Hauptmetabolite, der Homovanillinsäure (HVA), der 5-Hydroxy-indolessigsäure (5-HIAA) und des 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykolsulfates (MHPG-SO₄) wurden verschiedene Trennungsmethoden verbessert oder neu entwickelt.

Zur Abtrennung des Hauptmetaboliten des DA, der HVA, und des 5-HT, der 5-HIAA, erwies sich nach einigen Modifikationen die im Prinzip bekannte Extraktionsmethode mit Butylacetat am geeignetsten. Zur gemeinsamen Bestimmung der drei Amine DA, NA und 5-HT wurde eine Ionenaustauschmethode neu erarbeitet und für die Katecholamine (KA), DA und NA, mit einer Adsorptionsmethode an Aluminiumoxyd verglichen. Die Adsorption der KA mit Aluminiumoxyd nach Anton und Sayre (1962) erbrachte zwar durch einige Verbesserungen eine klarere Trennung, der Ionenaustausch hatte jedoch den Vorteil, alle drei Amine gleichzeitig bestimmen zu können. Der Säuremetabolit des NA, MHPG-SO₄, konnte als Anion gut auf einer im Prinzip bekannten Anionenaustauschssäule aus Sephadexharz isoliert werden.

Morphin, akut verabreicht, erhöhte die Entleerung des DA im Gehirn von Ratten, wenn es vor AMT oder Dopacetamid, jedoch nicht, wenn es nach AMT injiziert wurde. Es hatte keine Wirkung auf die Entleerung des NA oder 5-HT nach beiden Synthesehemmern. Die durch Probenecid bewirkte Akkumulation der HVA und der 5-HIAA war signifikant erhöht, während die Akkumulation des MHPG-SO₄ nicht verändert war.

Diese Befunde werden mit der Hypothese erklärt, daß Morphin den intraneuronalen Abbau von neusynthetisiertem DA und 5-HT in einer funktionell inaktiven Weise erhöht, ohne eine Wirkung auf die Amine zu zeigen, die bereits in den synaptischen Vesikeln aufgenommen sind. Die Beziehung dieser Stoffwechselveränderungen zu den pharmakologischen Wirkungen des Morphins wird diskutiert.

Die Entleerung des DA und 5-HT nach AMT oder Dopacetamid war durch chronische Morphingabe nicht verändert. Im Gegensatz dazu war die Akkumulation der HVA und 5-HIAA nach Probenecid signifikant erhöht; es zeigte sich jedoch keine Beziehung zwischen diesen biochemischen Veränderungen und dem Grad der Abhängigkeit und Toleranz der Tiere. Also übt Morphin auch nach chronischer Gabe einen störenden Einfluß auf den intraneuronalen Metabolismus des DA und 5-HT aus, d. h. es erhöht ebenso wie nach akuter Gabe die Synthese und den intraneuronalen Abbau von neusynthetisiertem DA und 5-HT, ohne ihre funktionelle Aktivität zu verändern. Es ist unwahrscheinlich, daß die Veränderung im Aminmetabolismus ursächlich mit den Mechanismen, die zur Abhängigkeit von Morphin führen, in Zusammenhang stehen.

NA wurde weder nach der Synthesehemmung vermehrt entleert, noch war die Akkumulation des MHPG-SO₄ erhöht. In der Gruppe mit dem höchsten Toleranzgrad war dessen Entleerung

nach AMT sogar verzögert. Nach diesen Ergebnissen wird
der Umsatz des NA weder funktionell aktiv noch funktionell
inaktiv durch akute oder chronische Morphingabe verändert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Ahlman, H., S. Grillner and M. Udo, 1971, The effect of 5-HTP on the static fusimotor activity and the tonic stretch reflex of an extensor muscle, *Brain Res.* 27, 393.
- Algeri, S. and E. Costa, 1971, Physical dependence on morphine fails to increase serotonin turnover rate in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 20, 877.
- Almgren, D. and P. Lundborg, 1971, Correlation of the recovery of the granular uptake-storage mechanisms and the nerve impulse induced release of (³H)-noradrenaline after reserpine, *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 671.
- Andén, N.-E., B.-E. Roos and B. Werdenius, 1963, On the occurrence of homovanillic acid in brain and cerebrospinal fluid and its determination by a fluorometric method, *Life Sci.* 7, 448.
- Andén, N.-E., M.-G.-M. Jukes, A. Lundberg and L. Vyklicky, 1966, The effect of DOPA in the spinal cord - I - Influence on transmission from primary afferent systems, *Acta physiol. scand.* 67, 373.
- Andén, N.-E., H. Corrodi and K. Fuxe, 1969, Turnover studies using synthesis inhibition, in: *Metabolism of amines in the brain*, ed. G. Hooper, publ. by Macmillan, London, p. 38.
- Andén, N.-E., A. Carlsson and J. Häggendal, 1969 a, Adrenergic mechanisms, *Ann. Rev. Pharmacol.* 9, 119.
- Andén, N.-E., S.G. Butcher, H. Corrodi, K. Fuxe and U. Ungerstedt, 1970, Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics, *Europ. J. Pharmacol.* 11, 303.

- Andén, N.-E., 1974, Effect of acute axotomy (spinal cord transection) on the turnover of 5-hydroxytryptamine, *Adv. in Biochem. Psychopharm.*, 10, 35.
- Anderson, E.G. and T. Shibuya, 1966, The effects of 5-hydroxytryptophan and l-tryptophan on spinal synaptic activity, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 153, 352.
- Anlezark, G.M., G.W. Arbuthnott, J.E. Christie, and T.J. Crow, 1971, Role of cerebral dopamine in the action of psychotropic drugs, *Brit. J. Pharmacol.*, 41, 406.
- Anton, A.H. and D.F. Sayre, 1962, A study of the factors affecting the aluminium oxidetrihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 138, 360.
- Ayhan, I.H. and A. Randrup, 1973, Behavioural and pharmacological studies on morphine-induced excitation of rats. Possible relation to brain catecholamines, *Psychopharmacologia (Berl.)* 29, 317.
- Bennet, Jr., J. P., A.H. Mulder and S.H. Snyder, 1974, Neurochemical correlates of synaptically active amino acids, *Life Sci.* 15, 1045.
- Besson, M.J., A. Cheramy and J. Glowinski, 1971, Effects of some psychotropic drugs on dopamine synthesis in the rat striatum, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 177, 196.
- Bläsig, J., A. Herz, K. Reinhold and S. Zieglgänsberger, 1973, Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats, *Psychopharmacologia (Berl.)* 33, 19.

- Bolme, P., H. Corrodi and K. Fuxe, 1973, Possible mechanism of the hypotensive action of 2,6-dichlorobenzyldine, aminoguanidine: evidence for control noradrenaline receptor stimulation, *Europ. J. Pharmacol.* 23, 175.
- Broch, O.J. and F. Fonnum, 1972, The regional and subcellular distribution of catechol-O-methyl-transferase in the rat brain, *J. Neurochem.* 19, 2049.
- Broch, O.J., 1973, The postnatal development of catechol-O-methyl-transferase in the rat brain, *J. Neurochem.* 20, 847.
- Brodie, B.B. and P.A. Shore, 1957, Concept for the role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 66, 631.
- Carlsson, A. and B. Waldeck, 1958, *Acta physiol. scand.* 44, 293.
- Carlsson, A., H. Corrodi and B. Waldeck, 1963, α -Substituierte Deopacetamide als Hemmer der Catechol-O-methyl-transferase und der enzymatischen Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren. In den Catecholamin-Metabolismus eingreifende Substanzen, 2. Mitteilung, *Helv. chim. Acta* 46, 2271.
- Carlsson, A., 1970, Effect of drugs on amine uptake mechanisms in the brain, in: *Bayer Symposium II*, Springer-Verlag Heidelberg, 223.
- Celsen, B. and K. Kuschinsky, 1974, Effects of morphine on kinetics of ^{14}C -dopamine in rat striatal slices, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 284, 159.
- Chang, C.C., 1964, A sensitive method for spectrophotofluorometric assay of catecholamines, *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 643.

- Cheney, D.L., A. Goldstein, S. Algeri and E. Costa, 1971, Narcotic tolerance and dependence: Lack of relationship with serotonin turnover in the brain, *Science* 171, 1169.
- Cheney, D.L. and A. Goldstein, 1971, The effect of p-chlor-phenylalanine on opiate-induced running, analgesia, tolerance and physical dependence in mice, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 177, 309.
- Clarke, D.E. and S.S. Sampath, 1973, Studies on the functional role of intraneuronal monoamine oxidase, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 187, 539.
- Clouet, D.H. and M. Ratner, 1970, Catecholamine biosynthesis in brains of rats treated with morphine, *Science* 168, 854.
- Corrodi, H. and B. Werdenius, 1965, Oxidative conversion of homovanillic acid to a fluorescent compound, *Acta chem. scand.* 19, 1854.
- Corrodi, H. and L.C.F. Hanson, 1966, Central effects of an inhibitor of tyrosine hydroxylation, *Psychopharmacologia (Berl.)* 10, 116.
- Costa, E. and N.H. Neff, 1966, Isotopic and non-isotopic measurements of the rate of catecholamine biosynthesis, in: *Biochemistry and pharmacology of the basal ganglia*, eds. E. Costa, L.J. Côte and M. Oyahr, Raven Press Hewlett, New York, p. 141.
- Costa, E., A.R. Green, S.H. Koslow, H.F. Lefevre, A.V. Revuelta and C. Wand, 1970, Dopamine and norepinephrine in noradrenergic axons: a study in vivo of their precursor product relationship by mass fragmentography and radiochemistry, in: *Increased synthesis of CA without changes in enzyme levels*, *Pharmacol. Rev.* 24, 2, 167.

- Costa, E., A. Carenzi, A. Guidotti and A. Revuelta, 1973, Narcotic analgesics and the regulation of neuronal catecholamine stores, Proc. III. Internat. Symposium on Catecholamines, Strasbourg.
- Da Prada, M., A. Pletscher and J.P. Tanzer, 1971, Storage of ATP and 5-hydroxytryptamine in blood platelets of guinea pigs, J. Physiol. (Lond.) 217, 679.
- Dahlström, A. and K. Fuxe, 1964, Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the CNS - I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, Acta physiol. scand. 62, suppl. 232.
- Elliott, K.A.C. and N.M. van Gelder, 1959, Occlusion and metabolism of gamma-aminobutyric acid in brain tissue, J. Neurochem. 3, 28.
- Feldberg, W. and V.J. Lotti, 1967, Temperature response to monoamines and an inhibitor of MAO injected into the cerebral ventricles of cats, Brit. J. Pharmacol. 31, 152.
- Ferguson, G.A., 1966, Statistical analysis in psychology and education, Mc-Graw Hill Book Com., New York.
- Fukui, K., H. Shiomi and H. Takagi, 1972, Effect of morphine on tyrosine hydroxylase activity in mouse brain, Europ. J. Pharmacol. 19, 123.
- Fukui, K. and H. Takagi, 1972, Effect of morphine on the cerebral contents of metabolites of dopamine in normal and tolerant mice: its possible relation to analgesic action, Brit. J. Pharmacol. 44, 45.

- Fuxe, K., 1965, Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV - Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system, *Acta physiol. scand.* 64, suppl. 247, 37.
- Fuxe, K. and U. Ungerstedt, 1970, Histochemical, biochemical and functional studies on central monoamine neurons after acute and chronic amphetamine administration, in: *Amphetamines and related compounds*, eds. E. Costa and S. Garattini, Raven Press New York, p. 257.
- Giacalone, E. and L. Valzelli, 1966, A method for the determination of 5-hydroxyindole-3 acetic acid in brain, *J. Neurochem.* 13, 1265.
- Gibson, R.D. and J.E. Tingstad, 1970, Formulations of a morphine implantation pellet suitable for tolerance and physical dependence studies in mice, *J. Pharmacol. Sci.* 59, 426.
- Goldstein, D.B. and A. Goldstein, 1961, *Biochem. Pharmacol.* 8, 48.
- Goodlet, I. and M.F. Sugrue, 1972, Effects of acutely administered analgesic drugs on rat brain 5-hydroxytryptamine turnover, *Brit. Pharmacol. Soc.*, 562.
- Grahame-Smith, D.G., 1974, How important is the synthesis of brain 5-hydroxytryptamine in the physiological control of its central function? in: *Serotonin, new vistas* (Proc. Internat. Symposium on 5-hydroxytryptamine, Cagliari, Sardinia, 1973), *Advanc. Biochem. Psychopharmacol.* 10, 83.

- Gunne, L.-M., J. Jonsson and K. Fuxe, 1969, Effects of morphine intoxication on brain catecholamine neurons, *Europ. J. Pharmacol.* 5, 338.
- Häggendal, J. and T. Malmfors, 1969, The effect of nerve stimulation on catecholamines taken up in adrenergic nerves after reserpine pretreatment, *Acta physiol. scand.* 75, 33.
- Haubrich, D.R. and D.E. Blake, 1973, Modification of serotonin metabolism in rat brain after acute or chronic administration of morphine, *Biochem. Pharmacol.* 22, 2753.
- Herz, A., J. Bläsig and R. Papeschi, 1974, Role of catecholaminergic mechanisms in the expression of the morphine abstinence syndrome in rats, *Psychopharmacologia (Berl.)* 39, 121.
- Herz, A. and J. Bläsig, 1974, Neurobiologische Aspekte der Morphin-Abhängigkeit, *Naturwissenschaften* 61, 232.
- Himmelsbach, C.K., 1943, *Fed. Proc.* 2, 201.
- Ho, I.K., S.E. Lu, S. Stolman, H.H. Loh and E.L. Way, 1972, Influence of p-chlorophenylalanine on morphine tolerance and physical dependence and regional brain serotonin turnover studies in morphine tolerant-dependent mice, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 182, 155.
- Hoffmeister, F., 1968, *Tierexperimentelle Untersuchungen über den Schmerz und seine pharmakologische Beeinflussung*, Editio Cantor, Aulendorf.
- Iversen, L.L., 1967, The catecholamines, *Nature (Lond.)* 214, 8.
- Iversen, L.L., 1972, in: *Perspectives in neuropharmacology*, S.H. Snyder, ed., Oxford University Press, New York, p.75.

- Jaffé, J.H. and S.H. Sharpless, 1968, in: The addictive states Ass. in Research in nervous and mental disease, A.J. Wikler, ed., Williams & Wilkins, Baltimore 46, p.226.
- Janssen, P-A.J., 1965, The evolution of the butyrophenons, haloperidol and trifluoperidol, from meperidine-like 4-phenylpiperidines, Intern. Rev. Neurobiol. 8, 221.
- Javoy, F. and J. Glowinski, 1971, Dynamic characteristics of the "functional compartment" of dopamine in dopamineergic terminals of the rat striatum, J. Neurochem. 18, 1305.
- Jonsson, J. and T. Lewander, 1970, A method for the simultaneous determination of 5-hydroxy-3-indole-acetic acid (5-HIAA) and 5-hydroxy-tryptamine (5-HT) in brain tissue and cerebrospinal fluid, Acta physiol. scand. 78, 43.
- Jouvet, M., 1969, Biogenic amines and the states of sleep, Science 163, 32.
- Kluge, H., 1974, Biogene Amine und ihre Bedeutung bei neuro-psychiatrischen Erkrankungen, in: Neue Forschungsergebnisse des Hirnstoffwechsels und der Entmarkungsenzephalomyelitis, R.M. Schmidt, ed., Wissenschaftliche Beiträge der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg 1974/3 (R25) Kommissionsverlag J.A. Barth, Leipzig.
- Koe, B.K., 1971, Tryptophan hydroxylase inhibitors, Fed. Proc. 30, 886.
- Korf, J. and T. Valkenburgh-Sikkema, 1969, Fluorometric determination of 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine and cerebrospinal fluid, Clin. chim. Acta 26, 301.

- Korf, J. and H.M. Van Praag, 1971, Amine metabolism in the human brain: Further evaluation of the probenecid test, *Brain Res.* 35, 221.
- Korf, J., G.K. Aghajanian and R.H. Roth, 1973, Stimulation and destruction on the locus coeruleus: Opposite effects on 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulfate levels in the rat cerebral cortex, *Europ. J. Pharmacol.* 21, 305.
- Krnjević, K., 1970, Glutamate and gamma-aminobutyric acid in brain, *Nature (Lond.)* 228, 119.
- Kuschinsky, K. and O. Hornykiewicz, 1972, Morphine catalepsy in the rat: Relation to striatal dopamine metabolism, *Europ. J. Pharmacol.* 19, 119.
- Kuschinsky, K., 1973, Evidence that morphine increases dopamine utilization in corpora striata of rats, *Experientia* 29, 1365.
- Kuschinsky, K. and O. Hornykiewicz, 1974, Effects of morphine on striatal dopamine metabolism: possible mechanisms of its opposite effect on locomotor activity in rats and mice, *Europ. J. Pharmacol.* 26, 41.
- Laverty, R. and K.M. Taylor, 1968, The fluorometric assay of catecholamines and related compounds: Improvements and extensions to the hydroxyindole technique, *Analyt. Biochem.* 22, 269,
- Lewitt, M., S. Spector, A. Sjoerdsma and S. Udenfried, 1965, Elucidation of the rate limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 148, 1.

- Livett, B.G., L.B. Geffen and L. Austin, 1968, Axoplasmic transport of ^{14}C -noradrenaline and protein in splenic nerves, *Nature (Lond.)* 217, 278.
- Lovenberg, W., H. Weissbach and S. Udenfried, 1962, Aromatic L-amino acid decarboxylase, *J. biol. Chem.* 237, 89.
- Lovenberg, W. and S.J. Victor, 1974, Regulation of tryptophan and tyrosine hydroxylase, *Life Sci.* 14, 2337.
- Maickel, R.P. and F.P. Miller, 1970, Fluorometric determination of indole derivatives, *Life Sci.* 9, 747.
- Marshall, I. and D.G. Grahame-Smith, 1970, Unchanged rate of brain serotonin during chronic morphine treatment and failure of parachloro-phenylalanine to attenuate withdrawal syndrome in mice, *Nature (Lond.)* 228, 120.
- Maruyama, Y., G. Hayashi, S.E. Smits and E. Takemori, 1971, Studies on the relationship between 5-hydroxytryptamine turnover in brain and tolerance and physical dependence in mice, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 178, 20.
- Meek, J.L. and N.H. Neff, 1972, Fluorometric estimation of 4-hydroxy-3-methoxyphenylethyleneglycol sulphate in brain, *Brit. J. Pharmacol.* 45, 435.
- Moore, K.E. and J.A. Dominic, 1971, Tyrosine hydroxylase inhibitors, *Fed. Proc.* 30, 859.
- Murphy, G.F., D. Robinson and D.F. Sharman, 1969, The effect of tropolone on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the brain of the mouse, *Brit. J. Pharmacol.* 36, 107.
- Neal, M.J., 1968, Failure of morphine dependence in rats to influence brain noradrenaline turnover, *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 950.

- Neff, N.H., T.N. Tozer and B.B. Brodie, 1967, Application of steady-state kinetics to studies of the transfer of 5-hydroxyindoleacetic acid from brain to plasma, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 158, 214.
- Papeschi, R., 1972, Dopamine, extrapyramidal system and psychomotor function, *Psychiat. Neurol. Neurochir. (Amsterd.)* 75, 13.
- Pletscher, H., 1970, A biophysical model for the storage and release of biogenic monoamines at the level of the storage organelles, in: *Biochemistry of simple neuronal models. Advances in biochemical psychopharmacology*, E. Costa and E. Giacomini, eds., Raven Press, New York, Vol. 2, p.205.
- Puri, S.K., Ch. Reddy and H. Lal, 1973, Blockade of central dopaminergic receptors by morphine: Effect of haloperidol, apomorphine or bsztropine, *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.* 5, 389.
- Rutledge, C.O. and J. Jonason, 1967, Metabolic pathways of dopamine and norepinephrine in rabbit brain in vitro, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 157, 493.
- Reinhold, K., J. Bläsigg and A. Herz, 1973, Changes in brain concentration of biogenic amines and the antinociceptive effect of morphine in rats, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 278, 69.
- Sedvall, G.C., V.K. Weise and I.J. Kopin, 1968, The rate of norepinephrine synthesis measured in vivo during short intervals. influence of adrenergic nerve impulse activity, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 159, 274.

- Sharman, D.F., 1973, The catabolism of catecholamines, Brit. med. Bull. 29, 110.
- Shen, F.H., H.H. Loh and E.L. Way, 1970, Brain serotonin turnover in morphine tolerant-dependent mice. J. Pharmacol. exp. Ther. 175, 427.
- Smith, C.B., J.E. Villarreal, J.H. Bednarczyk and M.I. Sheldon, 1970, Tolerance to morphine-induced increases in ^{14}C -catecholamine synthesis in mouse brain, Science 170, 1106.
- Smith, C.B., 1972, Neurotransmitters and the narcotic analgesics, in: Chemical and biological aspects of drug dependence, CRC Press Cleveland, p.495.
- Smith, C.B., M.I. Sheldon, J.H. Bednarczyk and J.E. Villarreal, 1972, Morphine induced increases in the incorporation of ^{14}C -tyrosine into ^{14}C -dopamine and ^{14}C -norepinephrine in the mouse brain: antagonism by naloxone and tolerance, J. Pharmacol. exp. Ther. 180, 547.
- Sourkes, T.L. and L.J. Poirier, 1968, in: Advances in Pharmacol., Vol. 6 A, S. Garathini and P.A. Shore, eds., Academic Press, New York, p.335.
- Spector, S., A. Sjöedsmå and S. Udenfried, 1965, Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by gamma-methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase, J. Pharmacol. exp. Ther. 147, 86.
- Stein, L., 1971, Neurochemistry of reward and punishment, some implications for the etiology of schizophrenia, J. Psychiat. Res. 8, 345.

- Sugrue, M.F., 1972, Effects of morphine and pentazocine on rat brain noradrenaline and dopamine turnover, Proc. 5. Intern. Pharmacology Congr., San Francisco, p. 225.
- Sulser, F. and E. Sanderbush, 1971, Effect of drugs on amines in the CNS, Ann. Rev. Pharmac. 11, 209.
- Svensson, T.H. and B. Waldeck, 1971, On the relation between motor activity and degree of enzyme inhibition following inhibition of tyrosine hydroxylase, Acta pharmacol. (Kbh.) 29, 60.
- Tarver, J.H. and S. Spector, 1970, Catecholamine metabolic enzymes in the vasculature, Fed. Proc. 29, 279 Abstr.
- Theiss, P., A. Herz and J. Bläsing, 1974, Vergleich der Entwicklung der Morphinabhängigkeit und Morphintoleranz bei Ratten, Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, 1014.
- Tryding, N., G. Tufvesson and S. Nilsson, 1971, Serummonoamineoxidase levels during levodopa therapy, The Lancet 1, 859.
- Udenfried, S., H. Weissbach and A. Sjöesdsama, 1956, Studies on tryptophane and serotonin in patients with malignant carcinoid, Science 123, 669.
- Udenfried, S., J.G. Christenson and W. Dairman, 1973, Decarboxylation of 5-hydroxytryptophan, in: Pharmacology and the future of man, Vol. 4: Brain, Nerves and Synapses, F.E. Bloom and G.H. Adeson, eds., S. Karger, Basel, p.245.
- Valzelli, L., 1973, Brain neurotransmitters, in: Psychopharmacology, W.E. Essman, ed., Spectrum Publications Inc., Flushing, New York, p.39.

- Valzelli, L., E. Giacolone and S. Consolo, 1973, Brain neurotransmitters, in: Psychopharmacology, W.E. Essman, ed., Spectrum Publications Inc., Flushing, New York, p.47.
- Von Euler, U.S. and N.A. Hillarp, 1956, Evidence for the presence of noradrenaline in submicroscopic structures of adrenergic axons, *Nature (Lond.)* 177, 44.
- Way, E.L., H.H. Loh and F. Shen, 1968, Morphine tolerance, physical dependence and synthesis of brain 5-hydroxy-tryptamine, *Science* 162, 1290.
- Way, E.L., H.H. Loh and F. Shen, 1969, Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 167, 1.
- Way, E.L. and F. Shen, 1971, Catecholamines and 5-hydroxy-tryptamine, in: Narcotic drugs, Biochemical Pharmacology, D.H. Clouet, ed., Plenum Press, New York, p.229.
- Way, E.L., 1972, Role of serotonin in morphine effects, *Fed. Proc.* 31, 113.
- Way, E.L., 1973, Brain neurohormones in morphine tolerance and dependence, in: Pharmacology and the future of man, Vol. 1, Proc. 5th Intern. Congr. Pharmacology, San Francisco 1972, F.E. Bloom and G.H. Adeson, eds., Karger, Basel, p.77.
- Weil-Malherbe, H., 1964, The simultaneous estimation of catecholamines and their metabolites, *Z. Klin. Chem.* 2, 161.
- Weiner, N., G. Cloutier, R. Bjur and R.I. Pfeffer, 1972, Modification of norepinephrine synthesis in intact tissue by drugs and during short-term adrenergic nerve stimulation, *Pharmacol. Rev.* 24, 203.

- Werman, R., R.A. Davidoff and M.H. Aprison, 1968, Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat, J. Neurophysiol. 31, 81.
- Wilk, S. and B. Zimmerberg, 1973, Absence of 3-methoxy-4-hydroxy-phenylethanol in brain, Biochem. Pharmacol. 22, 623.
- Williams, R.T. and J.W. Bridges, 1964, Fluorescence of solutions: a review, J. clin. Path. 17, 371.
- Yarbrough, G.G., D.M. Buxbaum and E. Sanderbush, 1971, Increased serotonin turnover in the acutely morphine treated rat, Life Sci. 10, 977.
- Yarbrough, G.G., D.M. Buxbaum and E. Sanderbush, 1973, Biogenic amines and narcotic effects, II. Serotonin turnover in the rat after acute and chronic morphine administration, J. Pharmacol. exp. Ther. 185, 328.
- Zeller, E.A., 1961, in: Monoamines et système nerveux central, Proc. Symp. Bel Air Genève, George & Cie. S.M., Genève, p.51.

LEBENS LAUF

<u>Peter Heinrich Theiss</u>	geboren am 19. 7.1944 in Püttlingen/Saar als Sohn des Apothekers Wilhelm Theiss und seiner Ehefrau Greta, geb. Weber
<u>Schulbildung</u>	1950 - 1954 ev. Volksschule Homburg/Saar 1954 - 1963 Staatl. Knaben- Realgymnasium Homburg/Saar
Reifeprüfung	März 1963 Homburg/Saar
<u>Berufsausbildung</u>	
Ausbildung als Apothekerpraktikant	Carolus-Apotheke, Frankfurt/M. Besitzer: Oskar Schweitzer
Pharmazeutisches Vorexamen	Februar 1965 Wiesbaden
Studium der Pharmazie	SS 1966 - SS 1970 Universität München
Pharmazeutisches Staatsexamen	September 1970
Kandidatenzeit	September 1970 - September 1971 Marktapotheke Homburg/Saar Besitzer: Wilhelm Theiss
Promotion	Seit März 1972 am Max-Planck- Institut für Psychiatrie, Abteilung Neuropharmakologie, in München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Herz (Leiter dieser Abteilung und des Theor. Instituts) und Herrn Prof. Dr. H.D. Stachel, Leiter des Insti- tuts für Pharmazie und Lebens- mittelchemie, München.

